Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Wien
(Direktor: Professor Dr. med. Ernst Lauda)
und aus der
Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
(Direktor: Professor Dr. med. Walter Dick)

Untersuchungen über die Wirkung von Thrombin auf neue synthetische Substrate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
BARBARA KÖBELE
aus Calw
1962

7387

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Wien
(Direktor: Professor Dr. med. Ernst Lauda)
und aus der
Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
(Direktor: Professor Dr. med. Walter Dick)

Untersuchungen über die Wirkung von Thrombin auf neue synthetische Substrate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
BARBARA KÖBELE
aus Calw
1962

Dekan: Professor Dr. med. K. Brecht

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Deutsch

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. W. Dick

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Problemstellung 3

Thrombinbildung 3

Bildung des endogenen Prothrombinumwandlungsfaktors 4
Bildung des exogenen Prothrombinumwandlungsfaktors 5
Andere Mechanismen der Thrombinbildung 7

Hemmstoffe von Thrombin 8

Eigenschaften von Thrombin 9

Allgemeine Bemerkungen zur Reaktionskinetik 11

Abhängigkeit von der Ferment- und der Substratkonzentration 12
Abhängigkeit vom pH-Wert 13
Einfluß der Ionenstärke 13
Abhängigkeit von der Temperatur 14
Hemmung des Reaktionsablaufes 14

Biologische Substrate und Kinetik der Thrombinwirkung 14

Fibrinogen 14

Andere biologische Substrate von Thrombin 16

Allgemeines über synthetische Substrate 18

Thrombin und seine synthetischen Substrate 20

II. Eigene Untersuchungen 25

Allgemeines 25

Synthese der Substrate 27

N-(α)-Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid 27
p-NO_2-Cbo-L-Arginin-β-Naphthylamid · HCl 27
L-Arginin-β-Naphthylamid · 2 HBr 28
Di-Cbo-L-Lysin-β-Naphthylamid 28
L-Lysin-β-Naphthylamid · 2 HBr 28
L-Lysin-β-Naphthylamid · Dipikrat 28
Di-Cbo-L-Ornithin-β-Naphthylamid 28
L-Ornithin-β-Naphthylamid · Monocitrat 29
L-Ornithin-β-Naphthylamid · Pikrat 29

Reagenzien, die bei der Ausführung der Versuche verwendet wurden 29

Beschreibung der Versuche 32

Allgemeine Bemerkungen zur praktischen Ausführung der Versuche 34

Wirkung des Thrombins auf die synthetischen Substrate 36

Einfluß des pH-Wertes 36
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid 36
L-Arginin-β-Naphthylamid 37
L-Ornithin-β-Naphthylamid 38
L-Lysin-β-Naphthylamid (in der Dihydrobromidform) 40

Einfluß der Inkubationszeit auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten 41
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid 41
L-Arginin-β-Naphthylamid 42
L-Lysin-β-Naphthylamid (in der Dihydrobromidform) 45

Einfluß verschiedener Substratkonzentrationen auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten 46
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid 46
L-Arginin-β-Naphthylamid 47
L-Lysin-β-Naphthylamid 47

Einfluß verschiedener Thrombinkonzentrationen auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten 48
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid 49
L-Arginin-β-Naphthylamid 49
L-Lysin-β-Naphthylamid 51

Beeinflussung der Blutgerinnung durch unsere synthetischen Substrate 51
Einfluß auf die II. Phase der Gerinnung 51
Einfluß auf die I. Phase der Gerinnung 51
Einfluß auf die Vorphase der Gerinnung 52

Einfluß von Diisopropylfluorphosphat (DFP) auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten 54
DFP als 10^{-3} molare Lösung (Ausgangskonzentration) 54
DFP als 10^{-2} molare Lösung (Ausgangskonzentration) und seine Wirkung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit 55

Prüfung von zwei weiteren synthetischen Substraten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Thrombin 56
L-Tyrosin-β-Naphthylamid 56
Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid 57

Vergleich zwischen der Wirkung von Thrombin auf synthetische Substrate in gewöhnlichen Glasröhrchen und in siliconisierten Glasröhrchen 58

Wirkung anderer Fermente des Gerinnungssystems und des fibrinolytischen Systems auf synthetische Substrate 58

Thrombokinase 59

Untersuchung der Wirkung von Hirnthrombokinase 59
Untersuchung der Wirkung von Plasmathrombokinase 60

Schlangengifte 60

Thrombinähnlich wirkende Schlangengifte 60
Thrombokinaseähnlich wirkende Schlangengifte 61
Untersuchung der Wirkung von Russell-Vipern-Gift 62

Plasmin 63

Untersuchung der Wirkung von Plasmin 65
Untersuchung der Wirkung von Streptokinase 66

III. Diskussion 68

IV. Zusammenfassung 77

V. Literatur 79

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549608_0006

I. Einleitung und Problemstellung

Das Thrombin, dessen physiologische Aufgabe es ist, das Fibrinogen zur Gerinnung zu bringen, wurde erstmals von Schmidt (1, 2) als Ferment angesehen. Hammersten (3) entdeckte, daß es sich bei der Bildung des Faserstoffes nicht um eine Synthese handelte, sondern daß es dabei zu einer Spaltung des Fibrinogens unter der Einwirkung von Thrombin kommt. Er nahm sogar schon eine hydrolytische Spaltung an, konnte diese aber noch nicht beweisen. Später leugneten dann Stuber und Lang (4) die Fermentnatur von Thrombin und faßten den Gerinnungsvorgang als rein kolloidchemisches Geschehen auf. Wöhlisch (5, 6) brachte dann die ursprüngliche Ansicht von Schmidt wieder zur Geltung; er faßte das Thrombin als eine Fibrinogendenaturase auf, ohne nähere Angaben über die am Molekül eintretenden Veränderungen zu machen. Durch den Nachweis kleiner Spaltprodukte, der Fibrinpeptide, jetzt auch als Cofibrine bezeichnet, durch Bailey und Mitarbeiter (7, 8, 9, 10, 11) wurde es offenbar, daß das Thrombin zu den proteolytischen Fermenten gehört. Sherry und Troll (12) untersuchten dann erstmals die Wirkung von Thrombin auf synthetische Substrate und verwendeten solche Substrate, die vorher zur Untersuchung von Trypsin und Chymotrypsin von Neurath, Schwerth und deren Mitarbeitern und von Bergmann und seiner Schule (13, 14) angewandt worden waren. Da diese Autoren jedoch mit Estern und Säureamiden als Substraten gearbeitet hatten, aber angenommen werden muß, daß das Thrombin im natürlichen Substrat Peptidbindungen löst, erschien es von Interesse, solche künstliche Substrate herzustellen und in ihrer Spaltung zu untersuchen.

Thrombinbildung

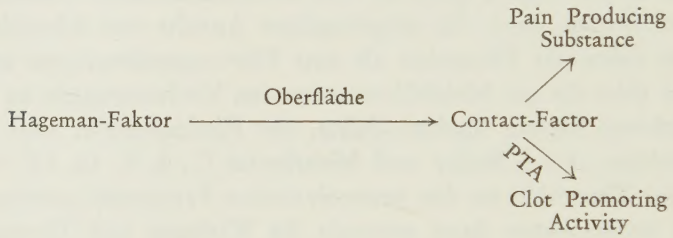
Das Gerinnungsferment Thrombin ist im Blut nicht in freier Form vorhanden, sondern muß erst aus einer Vorstufe, dem Prothrombin, aktiviert werden. Diese Aktivierung wird durch eine Kinase, die Thrombokinase oder Prothrombinase, ausgelöst, die ihrerseits erst aus einer Reihe von Vorstufen entstehen muß.

Man unterscheidet zwei Mechanismen der Bildung einer aktiven Thrombokinase. Bei dem einen sind lediglich im Blut enthaltene Faktoren beteiligt. Demgemäß bezeichnet man den Vorgang als die endogene Thrombokinasebildung,

das Endprodukt als Plasma-Thrombokinase. Beteiligen sich auch Gewebezellen an diesem Vorgang, so spricht man von exogener Thrombokinasebildung und bezeichnet das Endprodukt als Gewebe-Thrombokinase.

Bildung des endogenen Prothrombinumwandlungsfaktors (s. Schema S. 5)

An diesem Vorgang beteiligen sich nur Plasma- und Thrombozytenfaktoren. Auslösend wirkt die Berührung des Blutes mit benetzbaren Oberflächen. Im Organismus handelt es sich hierbei um pathologisch veränderte Gefäßendothelien oder um Wundflächen, außerhalb des Körpers meist um Glas. Zunächst reagiert der Hageman-Faktor mit der Oberfläche unter Bildung des („Contact-Factor" [Margolis (15, 16)]. Dieser Faktor beteiligt sich einerseits an der Bildung der PPS [Pain Producing Substance oder Plasmakinin (17)], andererseits reagiert er mit dem PTA-Faktor zur Bildung der „Clot Promoting Activity" [Margolis (18)] oder „Activation Product" [Waaler (19)].



Als nächstes folgt die Bildung des sogenannten Intermediärprodukt I (20, 21). Dabei beteiligen sich neben dem Activation Product die Faktoren VIII, IX und X, wobei wahrscheinlich Faktor IX als erster reagiert, die Faktoren VIII und IX das Substrat bilden und der Faktor X als Ferment eingreift (22, 23). Bei dieser Reaktion verschwindet Faktor VIII, jedenfalls entzieht er sich dem späteren Nachweis. An dieser Reaktion soll auch der Vorphasenaccelerator von Fisch und Duckert teilnehmen (22, 23). Nach den letztgenannten Autoren sollen Faktor IX und Vorphasenaccelerator unter der Einwirkung des Activation Product aus einer gemeinsamen Vorstufe entstehen. Auf Grund der neuesten Untersuchungen von Mammen und Seegers erscheint es jedoch wahrscheinlicher, daß der Faktor IX aus dem Prothrombin stammt (24, 25, 26).

$$\text{Vorstufe} \xrightarrow[(= \text{Activation Product})]{(\text{Ca}),\ \text{PTA},\ \text{Hageman-},\ \text{Contact-Factor}} \text{PPA} + \text{F IX}$$

$$\text{F IX} + \text{F VIII} \xrightarrow[(\text{Ca?},\ \text{PPA?})]{\text{F X}} \text{Intermediär-Produkt I}$$

Das Intermediärprodukt I reagiert anschließend mit dem Thrombozytenfaktor 3 zum Intermediärprodukt II (22, 23, 27). Da der Thrombozytenfaktor 3 in den Granula der Thrombozyten enthalten ist, müssen die letzteren wahrscheinlich zerstört werden, damit der Faktor 3 voll wirksam werden kann. Dieser als Visköse Metamorphose (V. M.) bezeichnete Vorgang wird durch das Activation Product (28) oder durch Thrombin eingeleitet (19, 21, 29, 30, 31, 32). Das Intermediärprodukt II reagiert mit dem durch eine kleine Menge Thrombin aktivierten Faktor V zur Bildung des bluteigenen Prothrombinumwandlungsfaktors (33, 34).

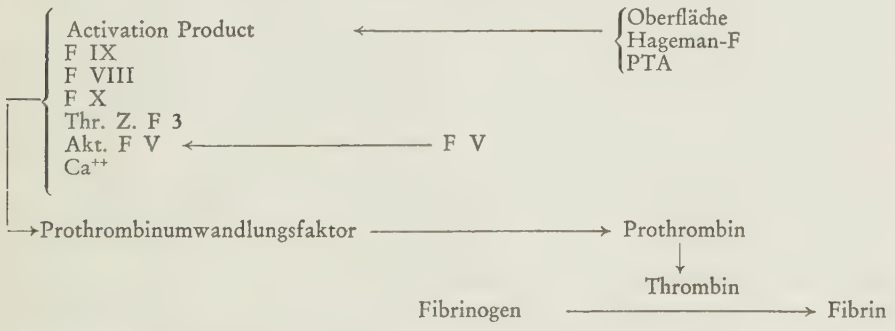
$$\text{Intermediärprodukt I} \xrightarrow[Ca^{++}]{\text{Thrombozytenfaktor 3}} \text{Intermediärprodukt II}$$

$$\text{Intermediärprodukt II} \xrightarrow{\text{Aktivierter Faktor V}} \text{Prothrombinumwandlungsfaktor}$$

Es ist schwierig, die Frage zu klären, woher jenes Thrombin, das zur Aktivierung des Faktor V erforderlich ist, kommt. Vielleicht ist es der adsorbierte Plättchenfaktor 1, der ohne Thrombin für den aktivierten Faktor V einspringen kann. Es wurde daher angenommen, daß für die Bildung des ersten Thrombin der an der Thrombozytenoberfläche adsorbierte Faktor V eine gewisse Bedeutung besitzt.

Es ist noch völlig ungeklärt, ob einzelne dieser Stufen stöchiometrisch oder enzymatisch ablaufen (20, 35), und ob der Prothrombinumwandlungsfaktor selbst als Ferment oder stöchiometrisch wirkt.

Schema der endogenen Thrombokinasebildung



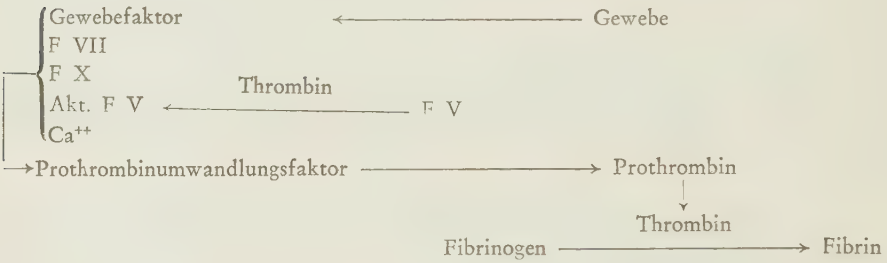
Bildung des exogenen Prothrombinumwandlungsfaktors (s. Schema S. 6)

Hier wird der inaktive Faktor VII zunächst durch Berührung mit benetzbaren Oberflächen oder mit Gewebefaktor zum aktiven Faktor VII umgewandelt (36). Für diese Reaktion sind Hageman- und PTA-Faktor nicht erforderlich (28), hier ist Faktor VII wesentlich, der dagegen im Intrinsic System keine Rolle spielt.

Nach Owren soll Faktor VII in einer inaktiven Form vorliegen und durch Kontakt mit benetzbaren Oberflächen oder durch Reaktion mit dem Gewebefaktor in eine aktive Form übergeführt werden (36). Es ist jedoch fraglich, ob diese Ansicht aufrecht erhalten werden kann. Wahrscheinlich ist die Vorstufe des Faktor VII in Wirklichkeit das Prothrombin (Mammen und Seegers) (24, 26, 37).

Faktor VII reagiert in Gegenwart von Calcium mit dem Gewebefaktor zu einem Intermediärprodukt, dem sogenannten Convertin (36). Dieses nun läßt mit dem durch eine kleine Menge Thrombin aktivierten Faktor V den Prothrombinumwandlungsfaktor (36) entstehen. An der Bildung des Intermediärproduktes beteiligt sich nach Koller auch der Faktor X, doch ist über seine genauen Angriffspunkte nichts Sicheres bekannt (38).

Schema der exogenen Thrombokinasebildung



In der II. Phase der Gerinnung wandelt das nun gebildete Thrombin das Fibrinogen in Fibrin um. Die II. Phase verläuft in 3 Stufen: zuerst kommt es zur Abspaltung der Fibrinpeptide A und B (7, 39, 40), wobei das Fibrinogen zu dem noch löslichen Fibrinmonomer umgewandelt wird. Danach kommt es zur Polymerisation der Fibrinmonomere zum Fibrinpolymer und schließlich zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes, des Fibringerinnsels (41, 42).

Bei der als III. Phase bezeichneten Retraktion löst sich das Gerinnsel unter dem Einfluß der Thrombozyten von der Gefäßwand ab (29, 30, 41, 44).

In einem häufig als IV. Phase bezeichneten Vorgang, der Fibrinolyse, kommt es zur Auflösung des Gerinnsels (41, 45, 46).

Der zeitliche Ablauf der Gerinnung, wie man ihn bei der Beobachtung der Gerinnungszeit sieht, erfordert je nach den Bedingungen etwa 10 Minuten. Von dieser Zeit entfällt der größte Teil auf die Bildung des Prothrombinumwandlungsfaktors, wenige Sekunden auf die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin und wieder wenige Sekunden auf die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (33, 41).

Verfolgt man die Thrombinbildung graphisch, so entsteht zuerst langsam, dann immer schneller und schließlich wieder langsamer werdend, Thrombin, so

daß eine S-förmige Kurve zustande kommt (41). Die Latenzzeit ist bedingt durch die Zeit, die vergeht bis die ersten Thrombinspuren gebildet sind, die für die Umwandlung von Plasma-Ac-Globulin in Serum-Ac-Globulin und die Auslösung der Viskösen Metamorphose erforderlich sind. Sobald dieses erste Thrombin gebildet ist, setzt eine immer schneller werdende Thrombinbildung ein. In dieser Art katalysiert das Thrombin seine eigene Entstehung, man bezeichnet dies nach Ware und Mitarbeitern als Co-Autokatalyse (43).

Andere Mechanismen der Thrombinbildung

Die beiden vorhin beschriebenen Formen der Thrombinbildung sind die physiologischen, aber nicht die einzig möglichen. Das in diesen Mechanismen gebildete Thrombin wird von Seegers als Biothrombin bezeichnet (33).

Eine Thrombinbildung kann auch durch einen künstlichen Prothrombinumwandlungsfaktor ausgelöst werden, welcher durch die Reaktion von Russell Viperngift mit den Faktoren V, X, Calcium und einem Lipoid entsteht (38).

Aber auch ohne jeglichen Zusatz kann nach den Untersuchungen von Seegers (33, 47) unter gewissen Bedingungen eine Umwandlung von Prothrombin in Thrombin erfolgen. Seegers hat gezeigt, daß nach Einbringen von Prothrombin in 25%iges Natrium-Citrat in Gegenwart einer kleinen Menge von Thrombin eine Umwandlung von Prothrombin in Thrombin möglich ist. Hierbei bildet sich unter der Einwirkung der hohen Dielektrizitätskonstanten und der hochkonzentrierten Neutralsalzlösung ein Prothrombin-Citrat-Komplex, der von Thrombin angegriffen werden kann (48, 49). Daraus entsteht ein Derivat, das weder Prothrombin- noch Thrombinaktivität besitzt; gleichzeitig werden Kohlenhydrate und Aminosäuren oder Polypeptide abgespalten (Dissoziationsphase) (41, 47, 50). Nach vorübergehendem Wiederauftreten von Prothrombinaktivität (Prothrombin-R) entsteht dann allmählich Thrombin (Aktivierungsphase) (41, 42, 47).

Für die Bildung des Thrombinderivates ist die Anwesenheit von Citrat, für die Umwandlung desselben in Thrombin die katalytische Wirkung von Thrombin erforderlich. Das Optimum der Reaktion liegt bei 37° C und einem pH von 8,2 (40). Die katalytische Wirkung von Thrombin kann durch SBTI (Sojabohnentrypsininhibitor) (33, 50, 51) oder TAMe (Tosylargininmethylester) [41, 52] gehemmt werden. Das so entstandene Thrombin wird von Seegers als Citrat-Thrombin bezeichnet (33). Es kann über Ionenaustauscher zu dem sogenannten Resin-Thrombin weiter gereinigt werden (50, 53).

Eine andere Art der Aktivierung ist diejenige mit Trypsin (49, 54, 55). Diese bedarf keines zusätzlichen Faktors wie die anderen Aktivierungsmethoden. Die Reaktion verläuft je nach der Herstellungsmethode des Prothrombinpräparates

katalytisch oder stöchiometrisch (49). Wahrscheinlich spaltet Trypsin Prothrombin in Thrombin und ein Reaktionsprodukt, das Trypsin inaktiviert.

Neueste Untersuchungen haben gezeigt (56), daß in einer Mischung von Prothrombin und Thrombin in physiologischer Kochsalzlösung ebenfalls sehr langsam Thrombin entsteht. Es ist derselbe Vorgang wie in Citratlösung, nur stark verlangsamt. Auch diese Reaktion ist mit der Bildung von Prothrombinderivaten verknüpft, die weder Prothrombin- noch Thrombineigenschaften haben, aber in einer Aktivierungsmischung Acceleratoreigenschaften aufweisen. Sie können durch Materialien biologischen Ursprungs nicht mehr in Thrombin umgewandelt werden, wohl aber in 25%iger Natrium-Citratlösung (56, 57, 58). Ein solches Derivat ist das Autoprothrombin I, das aus Prothrombin mit Plättchenfaktor 3 und Calcium-Ionen entsteht (56, 57, 59). Es zeigt die Eigenschaften des Faktor VII (37). Es kann mit Hilfe von Lebermitochondrien wieder in Prothrombin-R umgewandelt werden (56, 60), was dafür spricht, daß es ein echtes Prothrombinderivat darstellt.

Ein anderes Derivat ist das Autoprothrombin II, das aus Prothrombin mit Thrombin oder einem Lipid und F V entsteht (59). Dieses Autoprothrombin II zeigt die Eigenschaften des Faktor IX (25).

In letzter Zeit sind von verschiedenen Autoren Hinweise dafür erbracht worden, daß das Seegerssche Prothrombin keineswegs so hoch gereinigt ist wie der Autor zunimmt, sondern daß es vielmehr durch Substanzen, die am biologischen Aktivierungsmechanismus beteiligt sind, verunreinigt ist (35). Nach anderen Verfahren hergestellte und angeblich bezüglich der Beimischung anderer Gerinnungsfaktoren höher gereinigte Prothrombinpräparate sollen in Citrat nicht aktivierbar sein (35, 50, 61).

Da aber Seegers das Verschwinden der Prothrombinaktivität und das Entstehen der Aktivitäten von Autoprothrombin I und II in den entsprechenden Systemen quantitativ verfolgen und die genannten Faktoren weitgehend reinigen konnte, erscheint es wahrscheinlicher, daß die in Citrat nicht aktivierbaren Präparate entweder mit Hemmstoffen verunreinigt oder infolge intramolekularer Umlagerungen nicht aktivierbar sind.

Hemmstoffe von Thrombin

Die physiologische Antithrombinwirkung wird nicht von einer einheitlichen Substanz ausgeübt, sondern ist auf eine Reihe von Faktoren zurückzuführen. Nach Seegers (33, 62) unterscheidet man 4 Antithrombine. Als Antithrombin I bezeichnet man die Fähigkeit des Fibrins, Thrombin zu adsorbieren. Heparin gemeinsam mit einem plasmatischen Cofaktor wird als Antithrombin II bezeichnet. Es inaktiviert Thrombin sofort (34, 41, 62). Antithrombin III reagiert langsam mit Thrombin, wobei es aber selbst auch inaktiviert wird (63, 64). Bei entsprechend langer Beobachtung zerstört das Thrombin offenbar das Antithrombin und wird selbst wieder gerinnungsaktiv nachweisbar. Wahrscheinlich sind Antithrombin III und Heparin-Cofaktor dieselbe Substanz (34, 63), wobei

man sich vorstellt, daß Heparin die Reaktion zwischen Thrombin und Antithrombin beschleunigt (65, 66). Das Antithrombin IV entwickelt sich während und kurz nach der Aktivierung von Prothrombin (33, 41).

Artifizielle Inhibitoren können sowohl das Thrombin als auch das Fibrinogen beeinflussen. Zunächst ist es der SBTI, der die Gerinnungsaktivität, nicht aber die lytische Aktivität hemmt (12, 41, 67, 68, 69). DFP hingegen verbindet sich mit dem Serin des aktiven Zentrums von Thrombin und hindert damit jegliche Thrombinaktivität (39, 66).

Nachdem Thrombin für seine Wirkung freie Aminosäuren braucht (71), können alle oxydierenden Stoffe, die diese angreifen, die Thrombinaktivität hemmen (70). So stellen saure Farben wie Trypanblau und $KMnO_4$ Hemmstoffe für Thrombin dar (70); ferner Stoffe wie Tetranitromethan; auch Schwermetallsalze wirken hemmend (41).

Die Fibrinbildung kann durch Neutralsalze in höherer Konzentration infolge Steigerung der elektrischen Ladung und der elektrostatischen Repulsion, durch Harnstoff infolge Besetzung der die Querverbindungen bildenden Gruppen, durch KCNS und Ferrocyankali, durch Guanidin und Acetyltryptophan sowie durch Gallensäuren infolge Anlagerung und Verminderung der negativen Ladung gehemmt werden (41). Zahlreiche neutrale Alkohole und Amine, Dipole sowie Kationen und Anionen können die II. Phase reversibel hemmen.

Eigenschaften von Thrombin

Thrombin ist ein Eiweißkörper, wahrscheinlich kein Glucoproteid, da das im Biothrombin enthaltene Kohlenhydrat im Citrat-Thrombin fehlt, ohne daß dadurch die Aktivität beeinflußt wird (41).

Untersuchungen über den Gehalt von Rinder-Resin-Thrombin an Aminosäuren ergaben folgendes (71):

Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe, Gal. NH_2 (?), Lys, His, NH_3, Arg, Try.

Das Prothrombinmolekül ist ein sehr vielseitiges Molekül; je nach der Art der Aktivierung entstehen verschiedene Arten von Thrombin oder Prothrombinderivate (72). Das mit Hilfe von biologischen Aktivatoren gebildete Thrombin wird als Biothrombin bezeichnet (33). Es erscheint in der Ultrazentrifuge als inhomogenes Material (26). Es hat annähernd dieselbe Sedimentationskonstante wie das Prothrombin, nämlich S ~ 4,8 (26), aber bei der Elektrophorese sind die Eigenschaften beider sehr verschieden (53). Bei der Bildung von Biothrombin aus Prothrombin wird nur eine kleine Menge an Tyrosin und Kohlenhydrat frei (26), was darin zum Ausdruck kommt, daß das Molekül annähernd dieselbe Größe hat wie das Prothrombin (54). Das Rinderprothrombin hat bei einem pH von

6,85, einer Ionenstärke von 0,15 und einer Temperatur von 25 ° C eine Sedimentationskonstante von S = 4,89, eine Diffussionskonstante von D = 6,25. 10^{-7} cm^2/sec und ein Molekulargewicht von 62 700 (54). Im Gegensatz zu Prothrombin ist Biothrombin polydispers (26, 54).

Bei der Aktivierung von Prothrombin in 25%igem Natrium-Citrat entsteht das sogenannte Citrat-Thrombin (33). Bei seiner Bildung werden große Mengen an Tyrosin (38%) und Kohlenhydrat (46%) freigesetzt (26), sein Molekulargewicht ist daher wesentlich kleiner als das von Prothrombin. Entfernt man das Citrat durch Dialyse, so kann man eine Rekombination der Fragmente beobachten (26, 54, 56), wobei aber ein Aktivitätsverlust zu verzeichnen ist (54). In der Ultrazentrifuge zeigt sich, daß das Citrat-Thrombin aus mehreren Komponenten mit verschiedenen Molekulargewichten und verschiedenen Graden an biologischer Aktivität besteht (33, 54). Man kann hauptsächlich 4 Komponenten feststellen:

Die erste besteht aus kleinen Molekülen, die hauptsächlich dem Citrat zukommen.

Die zweite bildete etwa 15% des Ausgangsmaterials; sie hat ein Molekulargewicht von ~ 15 000 und eine Sedimentationskonstante von S ~ 2. Sie hat keine biologische Aktivität.

Die dritte Komponente stellt 32% des Ausgangsmaterials dar; sie hat ein Molekulargewicht von 45000 und eine Sedimentationskonstante von S = 4,1. Ihr kommt biologische Thrombinaktivität zu.

Die vierte Komponente besteht aus Aggregaten, die etwa 50% des Ausgangsmaterials darstellen und die ebenfalls biologische Thrombinaktivität bsitzen (54).

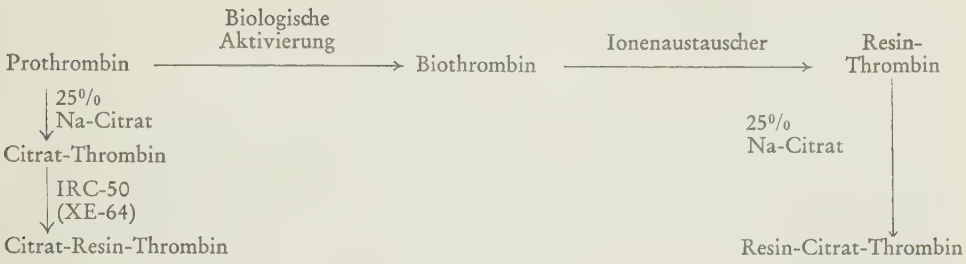
Wird das Citrat-Thrombin über Ionenaustauscher weiter gereinigt, so entsteht das Citrat-Resin-Thrombin (50, 53, 56), das in der Ultrazentrifuge homogen ist (53, 56); sein Molekulargewicht beträgt etwa 30 600 (53, 56); es hat eine Sedimentationskonstante von S = 3,9 (56). Gereinigtes Citrat-Resin-Thrombin bleibt monatelang stabil (53).

Bringt man Biothrombin (26) und solches nach Behandlung an Ionenaustauschern (41, 53) in eine Lösung von 25%igem Natrium-Citrat, so werden große Mengen von Tyrosin und Kohlenhydrat frei, und es bildet sich einerseits sogenanntes Bio-Citrat-Thrombin, andererseits Resin-Citrat-Thrombin (s. Schema S. 11).

Das durch Aktivierung mit Trypsin gebildete Thrombin weist in der Ultrazentrifuge 2 Gipfel auf, einen mit einer Sedimentationskonstanten von S = 4,01 und einen mit S ~ 2; außerdem sind noch Aggregate vorhanden (54). Bei seiner Aktivierung wird viel Tyrosin und Kohlenhydrat in Trichloressigsäure löslich; es hat ein sehr viel kleineres Molekulargewicht als das Biothrombin (26).

Das auf die verschiedenen Arten gebildete Thrombin ist nicht stabil; bei Lagerung nimmt seine Aktivität rasch ab (41); mit 50%igem Glyzerin kann

die Aktivität über 50 Tage aufrecht erhalten werden. Auch gegenüber Hitze ist Thrombin sehr empfindlich. Die Zerstörung beginnt bei 40° C und erfolgt rasch bei 56° C (41). Der isoelektrische Punkt von Thrombin liegt zwischen pH 4,5 und 5,0 (41).



[Nach Seegers und Levine (53)]

Allgemeine Bemerkungen zur Reaktionskinetik

Unter der Kinetik der Fermentwirkung versteht man den zeitlichen Ablauf vom Beginn der Fermentreaktion bis zur Bildung des Endproduktes.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei das Maß für die in der Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge. Die Verbrauchsgeschwindigkeit, d. h. die Konzentrationsabnahme des Ausgangsstoffes a, ist

$$- \frac{dc_a}{dt}$$

Die Bildungsgeschwindigkeit, d. h. die Konzentrationszunahme des Endproduktes b, ist

$$+ \frac{dc_b}{dt}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dann positiv, wenn mit zunehmender Zeit der reagierende Stoff abnimmt, es ist

$$RG = - \frac{da}{dt} = k \cdot a$$

k ist die Geschwindigkeitskonstante; sie zeigt den schnelleren oder langsameren Fortschritt der Reaktion an. Die Geschwindigkeit selbst aber ist nicht konstant, sie sinkt von anfänglichen Maximalwerten asymptotisch auf Null in dem Maße, in dem die Konzentration der reagierenden Stoffe kleiner wird.

Die Fermentreaktionen sind meist mono- oder bimolekulare Reaktionen, d. h. Reaktionen erster oder zweiter Ordnung. Eine Reaktion erster Ordnung bedeutet, daß die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes von der Konzentration einer einzigen Substanz abhängt (monomolekular), das gilt für die Zerfalls- wie für die Bildungsgeschwindigkeit.

Es ist $$RG = - \frac{da}{dt} = k \cdot a$$

Weil die Reaktionsgeschwindigkeit RG der ersten Potenz von a proportional ist, heißt die Gleichung „Zeitgesetz erster Ordnung". Für eine Reaktion zweiter Ordnung müssen 2 Moleküle zusammentreffen (bimolekulare Reaktion). Hier sind die Bildungs- und die Verbrauchsgeschwindigkeit proportional dem Produkt aus den jeweiligen Konzentrationen der verschwindenden Molekelarten.

$$- \frac{dc_x}{dt} = k_2 \cdot (C_A - C_x) \cdot (C_B - C_x)$$

bzw. $$- \frac{da}{dt} = k \cdot a^2$$

Den Anfang einer Fermentreaktion bildet meist eine Reaktion nullter Ordnung; hierbei ist die Reaktionsgeschwindigkeit RG eine konstante Größe, welche von der Anfangskonzentration unabhängig ist. In der Ausgangssituation findet sich meist ein großer Substratüberschuß, wogegen aber noch keine Reaktionsprodukte da sind. Die Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn entspricht dann annähernd der Grenzgeschwindigkeit. Später geht die Reaktion nullter Ordnung in eine Reaktion erster bzw. zweiter Ordnung über.

Abhängigkeit von der Ferment- und der Substratkonzentration

Ein Ferment beeinflußt im Reaktionssystem lediglich die Geschwindigkeit, nicht aber die Menge des Endproduktes. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt nun sowohl von der Konzentration des Fermentes als auch von der des Substrates ab, wenn alle übrigen Faktoren konstant gehalten werden. Bei konstanter Fermentkonzentration nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration zu, bis sie einen Grenzwert erreicht hat. Bei Substratüberschuß ist die Größe der Grenzgeschwindigkeit der Fermentkonzentration direkt proportional. Einen gesetzmäßigen Zusammenhang dieser Beobachtungen zeigt die Theorie von Michaelis, die auf der Annahme basiert, daß Ferment und Substrat miteinander unter Bildung eines unstabilen Komplexes reagieren, bei dessen Zerfall dann die Reaktionsprodukte entstehen.

Die Michaelis-Gleichung lautet so:

$$v = \frac{x \cdot V}{x + K_M}$$

wobei v die Reaktionsgeschwindigkeit, V die Grenzgeschwindigkeit, x die Substratkonzentration und K_M die Michaeliskonstante bedeuten. Ersetzt man in der obigen Gleichung v durch $\frac{V}{2}$, so ergibt sich

$$x = K_M$$

Das bedeutet, daß die Michaeliskonstante der Zahl nach gleich derjenigen Subtratkonzentration x ist, bei der die Hälfte der Grenzgeschwindigkeit erreicht ist.

Jedes Enzym hat eine charakteristische Michaeliskonstante. Ist letztere bekannt, so läßt sich die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat zahlenmäßig bestimmen.

Diesen Gesetzmäßigkeiten folgt auch das Thrombin mit seinen Substraten.

Abhängigkeit vom pH-Wert

Das pH-Optimum eines Enzyms wird durch den Scheitelpunkt der pH-Aktivitätskurve festgelegt. Ein Enzym besitzt nur in einer ganz bestimmten Ionenform katalytische Eigenschaften, und dieser Zustand herrchst beim optimalen pH. Wenn die Substrate der Enzyme selbst nicht ionisiert sind, so sind Form und Lage der pH-Kurve konstant. Bilden aber die Substrate selbst Ionen, so werden die Verhältnisse dadurch kompliziert, daß pH-Änderungen sowohl das Enzym als auch das Substrat beeinflussen, und die Resultante aus diesen Komponenten ergibt dann die endgültige pH-Aktivitätskurve. Für verschiedene Substrate ein und desselben Enzyms ergeben sich damit verschiedene pH-Kurven.

Die zuletzt geschilderten Verhältnisse zeigen sich auch bei der Reaktion zwischen Thrombin und seinen Substraten. Für jedes der Substrate findet man eine andere pH-Aktivitätskurve. Die Lage des pH-Optimum hängt außerdem noch von Milieufaktoren ab, wie Versuchsdauer, Temperatur, Gegenwart von Aktivatoren und Inhibitoren oder Art und Ionenstärke des Puffergemisches.

Einfluß der Ionenstärke

Die Ionenstärke, d. h. der Dissoziationsgrad des umgebenden Mediums, ist von großer Bedeutung für die Beziehung zwischen Enzym und Substrat. Jede Änderung der Ionenstärke kann die Reaktion hemmend oder fördernd beeinflussen, da das Puffersystem, in dem das Enzym wirkt, mehr oder weniger stark

beansprucht wird. Neben der Zahl der Ionen und ihrer Beweglichkeit spielt auch die Art der Ionen für die Hemmung oder Förderung des Reaktionsablaufes eine Rolle.

Abhängigkeit von der Temperatur

Die Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Prozesse ist stark temperaturabhängig. Die Enzyme erleiden schon bei niedriger Temperatur eine gewisse Inaktivierung. Die Temperaturaktivitätskurve stellt eine Resultante aus zwei entgegengesetzt wirkenden Prozessen dar, und zwar aus der Aktivität des Enzyms im eigentlichen Sinn und aus seiner Inaktivierung.

Die Aktivierungsenergie von Enzymen ist im allgemeinen gering, sie ist $Q_{10} \sim 2$. Das heißt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperatursteigerung um 10° C sich annähernd verdoppelt. Die zur Inaktivierung der Enzyme erforderliche Energie ist dagegen sehr hoch, sie ist $Q_{10} \sim 10$.

Hemmung des Reaktionsablaufes

Unter der Hemmung einer Enzymreaktion ist eine reversible Veränderung der Fermentaktivität zu verstehen. Irreversible Schädigungen (Denaturierung, z. B. mit DFP), dürfen nicht als Hemmung betrachtet werden. Man unterscheidet mehrere Hemmungstypen, die nicht kompetitive, die kompetitive Hemmung und die Hemmung durch Substratüberschuß. Die physiologische Hemmung, die auch für das Thrombin in Frage kommt, ist die kompetitive. Dabei konkurrieren Inhibitor und Substrat miteinander um den substratbindenden Teil des Enzyms. Das relative Ausmaß der Hemmung hängt von dem Verhältnis zwischen Inhibitor und Substrat ab. Solche Hemmstoffe sind z. B. die Antithrombine oder die infolge der Fermenttätigkeit auftretenden Reaktionsprodukte oder das synthetische Substrat TAMe.

Biologische Substrate und Kinetik der Thrombinwirkung

Fibrinogen

Das wichtigste Substrat von Thrombin ist das Fibrinogen. Unter der Einwirkung von Thrombin entsteht aus dem Fibrinogen das Fibrinmonomer, wobei kleine Peptide abgespalten werden. Unter den Spaltprodukten wurden von Bailey, Bettelheim, Lorand und Middlebrook (7), von Laki und Mitarbeitern (39) und von Blombäck (40) die Fibrinopeptide A und B isoliert und auf ihre Struktur untersucht.

Die Abspaltung ist mit einer Veränderung der Verteilung der Ladungen verbunden (33, 39). Das entstehende Fibrinmonomer bekommt einerseits 2—3 positive Ladungen, während es andererseits 12—14 negative verliert (39). Die

positiven Ladungen sind α-Aminogruppen. Auf Grund von Untersuchungen über die Hemmung von Thrombin durch DFP (48, 73) wurde festgestellt, daß das Serin einen Teil des aktiven Zentrums von Thrombin darstellt. Gestützt auf diese Ergebnisse wurde eine Theorie über die Art der Abspaltung der Peptide vom Fibrinogen ausgearbeitet (39), nach der das Serin über eine N, O-Acyl-Verschiebung im Fibrinogenmolekül die Spaltung bewirken könnte. Die beiden abgespaltenen Peptide enthalten Ariginin als C-terminale Aminosäure. Nachdem zusätzlich α-Aminogruppen des Glycins am Fibrin erscheinen (33, 74), muß Thrombin Arginin-Glycin-Bindungen spalten (74). Die Wirkung von Thrombin ist ähnlich der des Trypsins, aber sie ist beschränkt auf die beiden Arginin-Glycin-Bindungen im Fibrinogen (74). Diese beschränkte Spezifität beruht entweder auf den Aminosäuren in der unmittelbaren Nachbarschaft der beiden gespaltenen Peptidbindungen oder auf der Struktur des aktiven Zentrums von Thrombin (74). Das Fibrinogen besitzt als Endgruppen beim Rind Tyrosin und Glutaminsäure, das Fibrin dagegen Tyrosin und Glycin (33). Beim Menschen hat das Fibrinogen als N-terminale Reste Tyrosin und Alanin, das Fibrin dagegen Tyrosin und Glycin (33).

Die Abspaltung der Peptide kann als erste Stufe der Fibrinbildung von den beiden folgenden, an denen sich das Thrombin nicht mehr beteiligt, streng getrennt werden, indem man Thrombin in 1 m NaBr bei pH 5,3 auf Fibrinogen einwirken läßt (75). Es zeigt sich dann, daß sich das Fibrinmonomer in der Größe des Moleküls und in seinen Eigenschaften nur wenig vom Fibrinogen unterscheidet (42). Das Molekulargewicht des Fibrinmonomers (330 000) ist um 3% geringer als das des Fibrinogens (76). Beide können in 5 m Harnstoff gelöst werden, sie haben beide dieselbe Viskosität, dieselben Sedimentationswerte und Lichtstreuungseffekte; es ist also nur eine geringe Änderung des Fibrinogenmoleküls festzustellen.

Die Kinetik der Fibrinbildung ist erster Ordnung, sowohl bezüglich des Thrombin als auch des Fibrinogens (33,76); das gilt für Thrombinkonzentrationen von 25—135 Einheiten pro ml und für Fibrinogenkonzentrationen von 10—30 mg/ml (76).

Mißt man photoelektrisch die während der Thrombineinwirkung entstehende Trübung, so zeigt sich, daß bei jeder Thrombinkonzentration dieselbe Endabsorption erreicht wird, daß jedoch die dafür erforderliche Zeit von der Thrombinkonzentration abhängig ist. Die Thrombinkonzentration bestimmt auch die Dauer der Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Trübung (41). Die Beziehungen zwischen Enzymkonzentration und Gerinnungszeit sind so, daß die Logarithmen dieser Variablen umgekehrt proportional sind (41).

Die Fibrinogenkonzentration entscheidet über die Menge des Endproduktes. Bei konstanter Thrombinkonzentration ist die Flockungszeit umgekehrt propor-

tional der Fibrinogenkonzentration. Sinkt die Fibrinogenkonzentration unter den Optimalwert, so nimmt die Gerinnungszeit wiederum zu, weil dann ein Teil des Fibrins in Lösung bleibt (41).

Von Bedeutung für den Ablauf der Reaktion ist die Ionenstärke (40, 41). Eine Vermehrung der Ionenstärke von 0,1—0,3 bei einem pH von 7,0 ist mit einer kontinuierlichen Verlängerung der Koagulationszeit verbunden (40). Die optimale Ionenstärke für die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ist 0,1 (40). Auch die Art der Ionen des umgebenden Mediums ist von Bedeutung, so fördert z. B. Calcium in geringen Konzentrationen die Reaktion, während es in hohen Konzentrationen hemmt; das Optimum liegt bei 4 mMol (41). Magnesium, Strontium, Barium, Mangan wirken analog, während Beryllium hemmt (41). Alkalifluoride, ferner Kobalt, Nickel, Quecksilber, Kupfer, Eisen haben verkürzende Wirkung. NH_4^+ hat einen deutlichen, Li^+ und K^+ haben nur einen geringen verkürzenden Effekt.

Im Ganzen gesehen wird die Gerinnungszeit mit Zunahme der Ionenstärke und der Neutralsalzkonzentration verlängert.

Von großer Bedeutung für die Wirkung von Thrombin auf Fibrinogen ist der pH-Wert. Das pH-Optimum liegt in Tris-Puffer bei einer Ionenstärke von 0,2 zwischen pH 8,5 und 9,0 (40, 41). Die pH-Optima für die Reaktionen zwischen Thrombin und Gelatine, zwischen Thrombin und DFP und Thrombin und TAMe liegen, im Tris- und Imidazol-Puffer, ebenfalls zwischen pH 8,0 und 9,0, so daß die Annahme nahe liegt, daß dies das optimale pH für alle Thrombinreaktionen ist (77).

Auch die Temperatur ist für den Reaktionsablauf von Bedeutung. Die Geschwindigkeit der Reaktion nimmt mit steigender Temperatur zu und erreicht ein Optimum zwischen 35° C und 40° C. Dieses Temperaturoptimum ist allerdings auch von der Konzentration des Fibrinogens abhängig; mit abnehmender Fibrinogenkonzentration nimmt auch der Einfluß der Temperatur ab (41). Bei sehr niederen Fibrinogenkonzentrationen kommt es bei Temperaturzunahme sogar zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit, was auf die größere Löslichkeit des Fibrins bei steigenden Temperaturen und auf die Erhöhung der Dissoziationskonstanten des intermediären Enzym-Substrat-Komplexes zurückzuführen ist. Diese Dissoziationskonstante wirkt sich bei kleinen Substratkonzentrationen stärker aus als bei großen (41).

Andere biologische Substrate von Thrombin

Ein Subsrat für Thrombin ist auch das Fibrin. Guest und Ware (78) beobachteten zum ersten Mal, daß hohe Konzentrationen von Thrombin imstande sind, ein Fibringerinnsel aufzulösen. Man bezeichnet seitdem die lytische Aktivität

von Thrombin als „Guest-Ware-Effekt". Nach Lorand (42) ist die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und seine schließliche Lyse durch Thrombin als ein einheitlicher, stufenweiser Vorgang aufzufassen. Bei der Auflösung von Fibrin bei pH 8,6 und einer Ionenstärke von $\mu = 0{,}1$ entsteht zunächst ein einheitliches Produkt mit der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit von $1{,}6.10^{-5}\,cm^2.sec^{-1}.Volt^{-1}$. Später entwickeln sich mehrere kleine Bruchstücke, die sich von den unter Einwirkung von Fibrinolysin entstandenen eindeutig unterscheiden. Über die Kinetik dieser Reaktion ist nichts bekannt.

Auch die Thrombozyten geben ein Substrat für Thrombin ab. Thrombin führt bei seiner Wirkung auf die Thrombozyten mit Hilfe eines Plasma-Cofaktors die sogenannte Visköse Metamorphose (V.M.) herbei (19, 21, 29, 30, 31, 32). Wie Thrombin auf die Thrombozyten wirkt, weiß man noch nicht (29). Sicher ist, daß der Angriff sofort zu einer tiefgreifenden Permeabilitätsstörung in der Thrombozytenmembran führt (29). Die Thrombozyten werden klebrig, strecken Pseudopodien aus, das Hyalomer breitet sich aus und schließlich fließen sie zusammen; es ist dann keine Struktur mehr zu erkennen (19, 30). Die Thrombozyten enthalten einen Stoff, den „Clottable Factor" (Seegers), mit dem das Thrombin wie mit Fibrinogen reagiert. Es wurde in neuerer Zeit von Salmon und Bounameaux der Nachweis erbracht, daß der „Clottable Factor" mit Fibrinogen identisch ist (79). Ob die Kinetik der Wirkung von Thrombin auf Fibrinogen auch auf den „Clottable Factor" übertragen werden kann, weiß man noch nicht.

Über die Kinetik der Wirkung von Thrombin auf die Thrombozytenmembran ist ebenfalls nichts bekannt.

Thrombin hat die Fähigkeit, den Faktor VIII zu zerstören; dies geschieht schon durch geringe Thrombinkonzentrationen. Das läßt darauf schließen, daß Faktor VIII Arginin-Glycin-Bindungen im Molekül enthält (80). Nach Seegers (81) bewirkt Thrombin in Gegenwart von Calcium eine Kombination zwischen Faktor VIII und einem Lipidinhibitor, wobei Faktor VIII nicht zerstört wird. Über die Kinetik der Reaktion zwischen Thrombin und Faktor VIII ist nichts bekannt.

Der Faktor V stellt für Thrombin in zweierlei Richtung ein Substrat dar: In geringen Konzentrationen aktiviert das Thrombin den Faktor V, in hohen Konzentrationen aber zerstört es den aktivierten Faktor V (81). Auch hier ist über die Reaktionskinetik sehr wenig bekannt; es gibt gewisse Hinweise dafür, daß TAMe die Reaktion kompetitiv hemmt.

Nach Ansicht von Seegers soll auch gereinigtes Prothrombin ein Substrat für Thrombin darstellen (33), da im Citrat-Experiment die Prothrombinumwandlung durch Thrombin gefördert wird. Diese Wirkung des Thrombin wird durch TAMe kompetitiv gehemmt, so daß es möglich ist, gereinigtes Prothrombin mit TAMe zu stabilisieren (52, 97).

Nach den neuesten Ansichten aus der Seegersschen Schule (64) stellt auch Antithrombin III ein Substrat für Thrombin dar. Die Affinität von Thrombin zum Fibrinogen ist wesentlich größer als die zu Antithrombin III, so daß trotz der Gegenwart von Antithrombin III die II. Phase der Gerinnung abzulaufen vermag. Viel langsamer erfolgt dann die Bindung von Thrombin an das Substrat Antithrombin III. Thrombin wird jedoch etwa 72 Stunden nach Spaltung des Antithrombin wieder frei. Wie aus den Untersuchungen von Marckwardt (65) hervorgeht, beschleunigt Heparin die Reaktion zwischen Thrombin und Antithrombin so sehr, daß eine Reaktion mit Fibrinogen nicht zustande kommt. Nach diesem Autor soll die Reaktion zwischen Thrombin und Antithrombin zweiter Ordnung sein.

Allgemeines über synthetische Substrate

Um die Reaktionsabläufe zwischen proteolytischen Enzymen und ihren biologischen Substraten erforschen zu können, versuchte man, einfachere Substrate zu synthetisieren, die den Platz der sehr viel komplexeren natürlichen Substrate einnehmen können. Ferner war dies der Weg, um über die chemische Zusammensetzung der Enzyme, über ihre aktiven Zentren, über ihre Spezifität und schließlich auch über den Aufbau der biologischen Substrate Aufschluß zu bekommen.

Da die proteolytischen Enzyme keine prosthetische Gruppe besitzen, ist ihre katalytische Funktion an eine besondere Konfiguration der Aminosäurereste innerhalb des Enzymmoleküls gebunden. Es ist also, um Substrate synthetisieren zu können, notwendig, die strukturellen Erfordernisse für diese Enzyme genau zu bestimmen.

Zum ersten Mal wurden von Bergmann (13, 82, 83, 84, 85) und seiner Schule spezifische Peptidderivate synthetisiert und zwar zunächst für Trypsin und Chymotrypsin, später für Pepsin, Kathepsin, Papain u. a. Da Trypsin und Chymotrypsin in ihrem Spezifitätsbereich dem Thrombin sehr nahe stehen, mögen an ihnen die allgemeinen Betrachtungen weitergeführt werden.

Die von Bergmann (13, 82, 83, 84, 85) hergestellten Substrate waren ausschließlich Säureamide, die von dem Enzym in Ammoniak und den entsprechenden Aminosäurerest gespalten werden.

Später stellten Neurath und seine Mitarbeiter (86) fest, daß Trypsin ein wirksamer Katalysator der Hydrolyse gewisser Aminosäureester ist. Die empfindlichsten Substrate für Trypsin waren α-Benzoyl-L-Argininmethylester (BAMe) und Toluolsulfosäure („Tosyl")-L-Arigininmethylester (TAMe), die strukturellen Analoga der von Bergmann synthetisierten Säureamide. Nachdem Neurath und Mitarbeiter für Trypsin (86), Chymotrypsin (86) und Carboxypeptidase (87) dieselbe Eigenschaft, Ester zu spalten, festgestellt hatten, nahmen sie an, dies

sei ein allgemeines Attribut proteolytischer Enzyme; diese Annahme wurde bekräftigt, als Sherry und Troll (12) für Thrombin Esteraseaktivität nachweisen konnten.

Neurath und Mitarbeiter (86) stellten ferner fest, daß die Ester von den für sie spezifischen Enzymen wesentlich rascher gespalten werden als die entsprechenden, d. h. strukturell analogen, Amide. Sie nahmen an, der Unterschied in der Spaltungsgeschwindigkeit sei darauf zurückzuführen, daß die Aktivierungsenergie für die Amidspaltung höher ist als für die Esterspaltung; dieser Schluß wurde durch das Ergebnis der Untersuchungen über die Arrhenius-Aktivierungsenergie bestätigt. Außerdem konnten sie zeigen (88), daß die Abnahme an freier Energie bei der Peptidspaltung sehr viel stärker ist als bei der Esterspaltung.

Für die Spaltungsgeschwindigkeit ist außerdem die α-Aminogruppe in der Nachbarschaft der empfindlichen Gruppe von Bedeutung. Es kommt darauf an, ob sie frei, teilweise oder ganz substituiert ist. Für die Amidspaltung zeigten Neurath und Mitarbeiter (88) an Hand von Chymotrypsin, daß die Empfindlichkeit des Substrates durch Maskierung der α-Aminogruppe gesteigert wird, wobei es noch auf die Art der maskierenden Gruppe ankommt.

Für die Esterspaltung fanden Ravin, Bernstein und Seligman (89), daß die Hydrolyse durch Chymotrypsin bei Anwesenheit einer freien α-Aminogruppe zum Teil gehemmt wird. Werden beide H-Atome der α-Aminogruppe substituiert, so geht die Empfindlichkeit des Substrates gegenüber dem Enzym verloren, während die Substitution eines H-Atoms zu einer optimalen Empfindlichkeit des Esters führt. Dieses strukturelle Erfordernis wurde von Sherry und Troll für Thrombin bestätigt (12).

Die kinetischen Untersuchungen über die Beziehungen zwischen proteolytischen Enzymen und ihren synthetischen Estersubstraten ergaben, daß die Hydrolyse einer Reaktion nullter Ordnung folgt. Das wurde allgemein für die proteolytischen Enzyme (14, 86, 87, 88), einschließlich des Thrombin (12), nachgewiesen.

Für die Spaltung der Amide wurde zunächst angenommen, es handle sich um eine Reaktion erster Ordnung (13, 82, 83, 84, 85, 86). Genauere Untersuchungen (14, 90) ergaben dann, daß die Kinetik der Amidspaltung einer integrierten Michaelis-Menten-Gleichung folgt:

$$k'et = 2{,}3\ K_M \cdot \log \frac{a_o}{a} + (a_o - a)$$

Dabei bedeutet:

e die totale Enzymkonzentration

t die Zeit in Minuten

a_o die anfängliche Substratkonzentration in Mol pro l

a die Substratkonzentration zur Zeit t in Mol pro l

Die Gleichung stellt also einen Ausdruck für eine Reaktion dar, welche Elemente einer Reaktion erster ($k'et = 2{,}3\ K_M \cdot \log \frac{a_o}{a}$) und nullter ($k'et = [a_o—a]$) Ordnung enthält.

Die Reaktion erster Ordnung ist unabhängig von der anfänglichen Substratkonzentration, die Michaeliskonstante ist dabei relativ groß, so daß das Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Enzym zugunsten des freien verschoben und der Enzym-Substrat-Komplex klein ist.

Die Reaktion nullter Ordnung ist nur möglich bei anfänglich hoher Substratkonzentration; die Enzym-Substrat-Dissoziationskonstante ist dabei niedrig, so daß ein großer Teil des vorhandenen Enzyms im Enzym-Substrat-Komplex gebunden ist. Es wird also bei der Amidspaltung je nach der Substratkonzentration der eine oder der andere Faktor in der Michaelis-Menten-Gleichung dominieren, und dementsprechend wird sich der Reaktionsablauf gestalten.

Diese kinetischen Betrachtungen gelten für alle proteolytischen Enzyme, auch für das Thrombin hinsichtlich seiner Esterase- und seiner Gerinnungsaktivität.

Thrombin und seine synthetischen Substrate

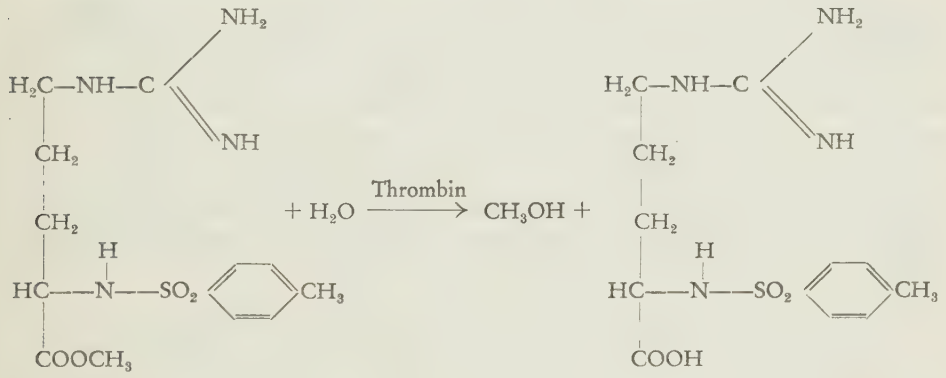
Die proteolytische Eigenschaft von Thrombin wurde wiederholt beschrieben: Zunächst von Hammersten (3), der die Spaltung des Fibrinogens durch Thrombin mit Hilfe der Elementaranalyse nachwies. Später entdeckten Fuchs und Zakrzewski (91) mit der von ihnen ausgearbeiteten kolorimetrischen Mikrostickstoffbestimmungsmethode, daß die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin mit einer Vermehrung des Reststickstoffes einhergeht. Bailey und Mitarbeiter (7), Laki und Mitarbeiter (39) und Blombäck (40) konnten dann die von Fibrinogen abgespaltenen Peptide isolieren und charakterisieren. Einen weiteren Beweis für die proteolytische Aktivität lieferten Guest und Ware (78), die zum ersten Mal nachwiesen, daß Thrombin fibrinolytische Aktivität besitzt.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen und in Anlehnung an die oben erwähnten Arbeiten über synthetische Substrate für proteolytische Enzyme untersuchten Sherry und Troll (12) als erste die Wirkung von Thrombin auf synthetische Substrate, wobei sie Aminosäureester verwendeten (92).

Von allen untersuchten Substraten waren die Argininester mit Substitution eines H-Atoms in der α-Aminogruppe am empfindlichsten (12, 52). Unter diesen steht der Tosylargininmethylester, kurz TAMe genannt, an erster Stelle. Dann folgen Benzoylargininäthylester und der nicht substituierte Argininmethylester; Argininamide sind viel weniger empfindlich; so ist das Verhältnis der Empfind-

lichkeiten zwischen Benzoylargininäthylester und Benzoylargininamid 400 : 1 (52). Andere Aminosäuren werden nicht gespalten; Thrombin scheint also spezifisch für Argininester zu sein. Obwohl man annehmen muß, daß bei der Spaltung des Fibrinogens Arginylglycinbindungen gespalten werden (21 b), ist es auffallend, daß ein synthetisches Arginylglycin von Thrombin nicht angegriffen wird und auch den Gerinnungsvorgang nicht hemmt. Tosylarginylglycin jedoch hemmt die Gerinnung deutlich und dürfte außerordentlich langsam von Thrombin gespalten werden. Dies hängt wahrscheinlich von der Substitution der α-NH_2-Gruppe des Argininpeptides ab (93).

Betrachtet man nun den Reaktionsablauf zwischen Thrombin und seinem empfindlichsten Substrat TAMe (12), so sieht man, daß als Spaltungsprodukte Tosylarginin und Methylalkohol entstehen, entsprechend der Gleichung:



TAMe Tosylarginin

Das pH-Optimum für diese Reaktion hängt vom verwendeten Puffer ab, in Tris-Puffer liegt es bei pH 9,0. Die Kinetik ist von nullter Ordnung bis 60—70% des Substrates gespalten sind. Die größte Geschwindigkeit der Reaktion wird bei einer Substratkonzentration von 0,04 m erreicht, die Michaeliskonstante ist dabei:

$$K_M = 4{,}3 \cdot 10^{-3}\ M,$$

was eine sehr hohe Affinität von Thrombin zu TAMe anzeigt. Das Temperaturoptimum der TAMe-Spaltung liegt bei 35° C.

Die Spaltung im TAMe durch Thrombin kann entweder durch Bestimmung des ungespalten gebliebenen Esters mit dem Hestrin-Verfahren (94, 95, 96) oder durch Bestimmung der freigesetzten Aminosäure mit Hilfe der Formoltitration (12, 95) verfolgt werden. Beide Verfahren sind umständlich und schwierig, vor allem haben sie in biologischem Milieu nicht zum gewünschten Erfolg geführt (97).

Die ursprünglich vertretene Ansicht, die Thrombinwirkung sei spezifisch gegen Arginin-Verbindungen gerichtet (12), mußte aufgegeben werden, als Ehrenpreis, Leach und Scheraga (67) zeigen konnten, daß Thrombin auch diejenigen Ester- und Peptidbindungen zu spalten vermag, die Lysinreste enthalten. Es ist jedoch bei gleichem pH eine größere Thrombinmenge erforderlich.

Bei der Wirkung von Thrombin auf Lysinäthylester (LEe) verläuft die Reaktion bezüglich LEe nach einer Kinetik nullter Ordnung, bezüglich Thrombin nach einer Kinetik erster Ordnung im Bereich von 0,02—0,04 m LEe und von 80—280 TAMe-Einheiten Thrombin pro ml.

Dementsprechend spaltet Thrombin auch die Lysin-Alanin-Bindung der B-Kette des Insulins (67).

Als weiteres synthetisches Substrat kommt auch Carbobenzoxy-L-tyrosin-p-nitrophenylester — kurz CTN genannt — in Frage, der ursprünglich für Chymotrypsin Verwendung fand (68, 69). Es ist auffallend, daß dieses Substrat so gut gespalten wird, obwohl Thrombin offenbar vorwiegend basische Aminosäuren angreift. Eine hypothetische Erklärung ist die, daß die Empfindlichkeit von acylierten, nicht basischen Aminosäureresten zum Teil durch die Elektronendichte des oxygenen Atoms gelenkt wird. Eine Reduktion in der Elektronendichte würde in einem Ester erwartet, der, wie der CTN, die p-Nitrophenoxyd-Gruppe enthält. Es resultiert dabei ein nivellierender Effekt dieser Gruppe auf die Spezifität des Aminosäurerestes (69).

Daß Thrombin neben seinen spezifischen biologischen Substraten auch synthetische Ester zu spalten imstande ist, wurde erstmals von Sherry und Troll beobachtet (12). Von besonderem Interesse erschien die Prüfung, in wieweit die Aktivitäten von Thrombin gegen biologische und synthetische Substrate miteinander parallel gehen. Um die Aktivitäten miteinander vergleichen zu können, war es notwendig, entsprechende Einheiten zu schaffen.

Die mit den verschiedenen Methoden gemessenen Thrombinaktivitäten werden folgendermaßen definiert:

Die Gerinnungsaktivität von Thrombin wird an einer standardisierten Fibrinogenlösung getestet. Sie wird in N.I.H. (National Institute of Health)-Einheiten ausgedrückt und folgendermaßen definiert: Eine N.I.H.-Einheit ist diejenige Menge Thrombin, welche 1 ml einer standardisierten Fibrinogenlösung in 15 Sekunden bei 28° C zur Gerinnung bringt.

Die Esteraseaktivität wird in TAMe-Einheiten ausgedrückt; dabei ist eine Einheit enzymatischer Aktivität als diejenige Menge Thrombin definiert, welche 1 µMol Säure in 10 Minuten aus 0,04 m TAMe bei pH 9,0 und 37° C freisetzt (12).

Eine TAMe-Einheit entspricht annähernd einer N.I.H.-Einheit (12).

Es ist in höchstem Maße wahrscheinlich, daß Gerinnungs (C)-Aktivität und Esterase (E)-Aktivität demselben Molekül und dem gleichen aktiven Zentrum zukommen. Hierfür sprechen die gleichzeitige Anreicherung beider Aktivitäten bei der Reinigung von Thrombin (12), die kompetitive Hemmung der Wirkung von Thrombin auf Fibrinogen und Prothrombin durch TAMe (12, 42, 52), die gleichzeitige Blockierung beider Aktivitäten durch DFP (48, 66) und die Tatsache, daß auch andere proteolytische Fermente gleichzeitig Peptidase- und Esteraseaktivität besitzen (86, 87).

Aber schon früh wurde darauf hingewiesen, daß die beiden Eigenschaften unabhängig voneinander sind. So zeigte Hudemann (98) eine verschiedene Temperaturabhängigkeit und eine verschiedene Fällbarkeit mit Ammonsulfat; und Schultze (99) beobachtete eine verschiedene Fällbarkeit mit Säuren.

Seegers jedoch hat darauf hingewiesen, daß Thrombinpräparate nicht zu jeder Zeit beide Eigenschaften besitzen müssen (100). So konnte er zeigen, daß während der Thrombinbildung zunächst die Esteraseaktivität entsteht, sich dann die Gerinnungsaktivität zusätzlich ausbildet (100) und bei Lagerung letztere zuerst verschwindet, während die Esteraseaktivität bestehen bleibt (56). Auch durch Einwirkung verschiedener Agentien oder verschiedener Aktivierungsbedingungen für Prothrombin kann die eine oder die andere Aktivität zurückgedrängt werden. So entsteht bei Aktivierung von Prothrombin in Calciumlösung zuerst Esteraseaktivität; die später gebildete Gerinnungsaktivität verschwindet wieder, während die Esteraseaktivität noch an Konzentration zunimmt (45). Durch Einwirkung von Ninhydrin kann die Gerinnungsaktivität zerstört werden, während die Esteraseaktivität erhalten bleibt (45). Durch Einbringen von Thrombinpräparaten in Natrium-Citrat oder Protaminsulfat oder durch Zugabe von Thrombozytenfaktor 3 wird die Esteraseaktivität vermindert, während die Gerinnungsaktivität erhalten bleibt (101). Acetyliertes Thrombin sowie aus acetyliertem Prothrombin gebildetes Thrombin besitzen nur Esteraseaktivität (100).

Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß SBTI wohl die Gerinnungsaktivität, nicht aber die Esteraseaktivität und die Wirkung auf andere synthetische Substrate hemmt (12, 41, 67, 68, 69).

Aus all diesen Beobachtungen geht hervor, daß offenbar die Esteraseaktivität die weniger spezifische Aktivität von Thrombin darstellt, die daher viel resistenter ist, während die Gerinnungsaktivität die spezifischere und daher empfindlichere ist. Dieses eigentümliche Verhalten der beiden Aktivitäten kann man wohl am ehesten so erklären, daß E-Thrombin und C-Thrombin jenen Teil des aktiven Zentrums gemeinsam haben, der durch DFP gehemmt wird, sich aber sonst in noch nicht näher bekannten Teilen des Moleküls unterscheiden.

Die Fähigkeit von Thrombin, TAMe zu spalten, wurde dazu benüzt, um eine Methode auszuarbeiten, mit der die Menge an Plasma-Prothrombin gemessen werden kann (96, 102). Setzt man bei der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin zur Aktivierungsmischung verdünnten TAMe (0,001 m endgültige Konzentration) zu, so wird die Reaktion verzögert, aber sie läuft vollständig ab. Dabei kann aber Antithrombin das entstehende Thrombin nicht zerstören wie das ohne TAMe-Zusatz der Fall ist, da die Affinität von Thrombin zu TAMe größer ist als die zu Antithrombin. Auf diese Art kann das gesamte aus Prothrombin entwickelte Thrombin gemessen werden. Erhöht man die TAMe-Konzentration auf 0,04 m, so wird die Prothrombinumwandlung sofort gestoppt. Das entstandene Thrombin spaltet nun den konzentrierten TAMe, und die freigesetzte Säure ist ein Maß für die Thrombinaktivität, von der man auf das im Plasma enthaltene Prothrombin schließen kann; denn eine Einheit Prothrombin ist definiert als diejenige Menge Prothrombin, die eine Einheit Thrombin liefert.

Diese Methode konnte aber bisher für die klinische Bestimmung von Plasma-Prothrombin nicht erfolgreich angewandt werden.

II. Eigene Untersuchungen

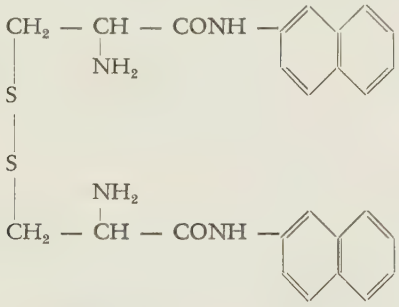
Allgemeines

Da die bisher bekannten synthetischen Substrate Ester waren, deren Spaltung nicht unbedingt der Spaltung von Peptidbindungen gleichzusetzen ist (86, 87), und der Nachweis der freigesetzten Säuren (12, 94, 95, 96), oder, bei Verwendung der bisher bekannten Säureamide, der Nachweis der Aminosäuren (87, 103), große Schwierigkeiten bereitete, erschien es zweckmäßig, Substrate zu suchen, die eine peptidähnliche Bindung enthalten, und deren Spaltprodukte leicht nachweisbar sind. Aus diesem Grund wurden β-Naphthylamide verschiedener L-Aminosäuren entwickelt, die beiden Forderungen gerecht werden.

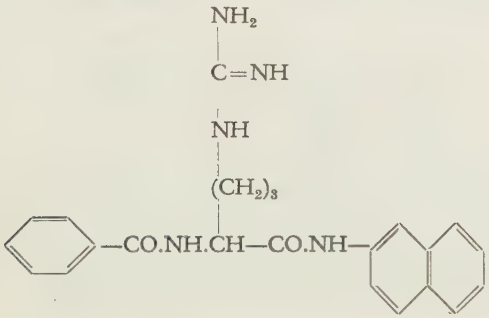
So haben Tuppy und Nesvadba (104, 105) ein im Schwangerenserum vorkommendes Enzym, die Oxytocinase, durch Inkubation mit L-Cystin-di-β-Naphthylamid (s. Formel I) einer quantitativen Bestimmung unterworfen, während Riedel, Wünsch und Hartl (103) mit Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid (s. Formel II) Trypsin bestimmen konnten. Wir haben nun die β-Naphthylamide des Tosyl-L-Arginins (s. Formel III), des L-Arginins (s. Formel IV), des L-Lysins (s. Formel V) und des L-Ornithins (s. Formel VI) hergestellt und ihr Verhalten gegenüber Thrombin geprüft. Außerdem haben wir das von Riedel, Wünsch und Hartl (103) dargestellte Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid (s. Formel II), das L-Tyrosin-β-Naphthylamid (s. Formel VII) und das L-Leucin-β-Naphthylamid (s. Formel VIII) in unsere Untersuchungen einbezogen.

Die oben erwähnten Substrate haben folgende Strukturformeln:

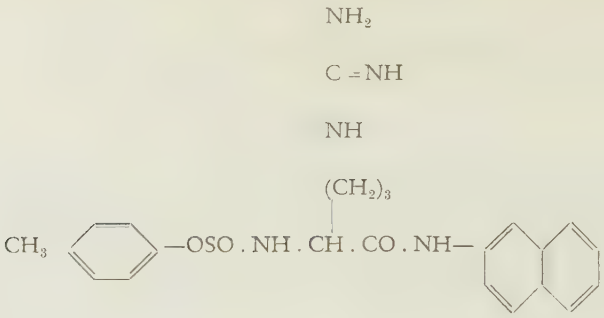
I. L-Cystin-di-β-Naphthylamid



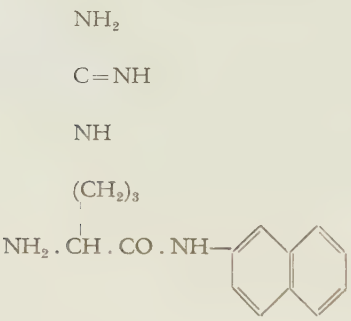
II. Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid



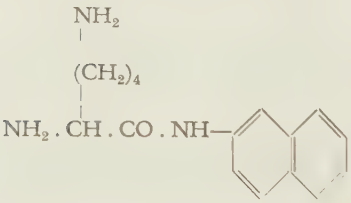
III. Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid



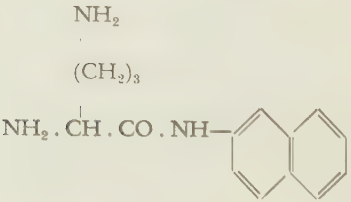
IV. L-Arginin-β-Naphthylamid



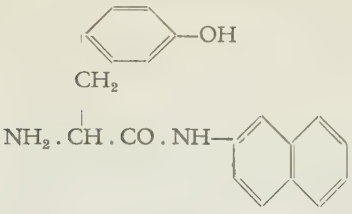
V. L-Lysin-β-Naphthylamid



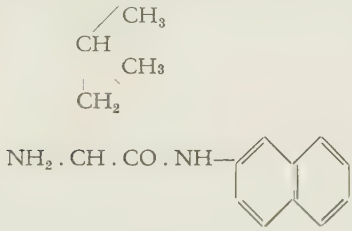
VI. L-Ornithin-β-Naphthylamid



VII. L-Tyrosin-β-Naphthylamid



VIII. L-Leucin-β-Naphthylamid



Synthese der Substrate

Die Herstellung unserer L-Aminosäure-β-Naphthylamide und deren Zwischenprodukte erfolgte am Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien. Wir gingen nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden vor, wobei die entsprechenden Carbobenzoxy (Cbo-)-Aminosäuren mit β-Naphthylamin nach der Sheehan'schen Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)-Methode (107) kondensiert wurden. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte nach Ben Ishai (108) mit 25%igem HBr-Eisessig. Da die freien β-Naphthylamide des L-Arginins und L-Lysins nur in Form von nicht kristallisierenden Ölen anfielen, haben wir für die enzymatischen Arbeiten die Hydrobromide eingesetzt. Zur chemischen Charakterisierung wurden entsprechende Derivate wie Zitrat, Pikrat, hergestellt.

N-(α)-Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid

5 g Tosyl-L-Arginin (108), 2,73 g DCCI und 3,10 g β-Naphthylamin werden in 18,2 ml DMFA gelöst. Nach dreitägigem Stehen bei Zimmertemperatur wird von ausgefallenem Harnstoff filtriert und mit absolutem Äther gefällt. Das ausgefallene Öl wird zwischen Wasser und Essigester verteilt. Nach Versetzen der wäßrigen Phase mit NH_3-Lösung bis zur alkalischen Reaktion fällt eine weiße Substanz aus, die mehrfach aus Essigsäure-NH_3 umgefällt wird. Nach dem Waschen mit heißem H_2O wird getrocknet, mit Äther zur Entfernung von β-Naphthylamin extrahiert.

A: 2,30 g, d. s. 32,3% d. Th., Fp. 215° Z.

$[\alpha]\ D^{17°} = -24°$ (c = 1, Eisessig).

$C_{23}H_{27}N_5O_5S$	C ber.: 60,90	C gef.: 60,62
M. G. 453,55	H ber.: 6,00	H gef.: 6,20
	N ber.: 15,44	N gef.: 15,36

p-NO_2-Cbo-L-Arginin-β-Naphthylamid · HCl

2 g p-NO_2-Cbo-L-Arginin (109) + 1,5 g β-Naphthylamin · HCl werden in 7 ml DMFA mit 1,1 g DCCI kondensiert. Nach dreitägigem Stehen wird mit Äther ausgefällt, mit heißem CO_3OH digeriert.

A: 1,74 g, d. s. 66% d. Th., Fp. 207—210° Z.

$(C_{24}H_{26}N_6O_5)$. HCl	C ber.: 55,96	C gef.: 55,83
M. G. 515,06	H ber.: 5,28	H gef.: 5,33
	N ber.: 16,35	N gef.: 16,31

L-Arginin-β-Naphthylamid · 2 HBr

1,87 g p-NO_2-Produkt werden mit 9 ml Eisessig übergossen, dazu 18 ml 40%iger HBr-Eisessig gegeben und eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wird im Vakuum eingedampft und mit Äther gefällt. Es entstehen 1,8 g Rohprodukt, d. s. 0,8% d. Th. Gelbliche Nadeln bilden sich aus absolutem Äthanol.

Fp. 182—184° Z. $[\alpha]D^{18} = +28°$ (c = 1, Äthanol).

$C_{16}H_{25}N_5OBr_2 \cdot 1/2\ C_2H_5OH$	N ber.: 14,40	N gef.: 14,35
M. G. 483,41		

Di-Cbo-L-Lysin-β-Naphthylamid

3,74 g Di-Cbo-L-Lysin (Öl) (110), 1,3 g β-Naphthylamin, 1,87 g DCCI werden in 9 ml DMFA gelöst. Nach Filtration des Harnstoffs wird im Vakuum eingedampft, mit Äther 3,76 g Rohprodukt gefällt. Es wird aus absolutem Äthanol umkristallisiert und mit Äther gewaschen.

Fp. 151,5—153,5° Z nach dem Trocknen im Hochvakuum.

A: 77,5% d. Th.

$C_{32}H_{33}N_3O_5$	C ber.: 71,15	C gef.: 71,19
M. G. 539,71	H ber.: 6,16	H gef.: 6,17
	N ber.: 7,80	N gef.: 7,87

L-Lysin-β-Naphthylamid · 2 HBr

1,87 g Di-Cbo-Produkt werden mit 4 ml Eisessig und 8 ml 40%igem HBr-Eisessig gespalten. Nach Abdampfen der Lösungen im Vakuum entstehen 1,42 g Dihydrobromid, welches aus Äthanol-Äther umgefällt wird.

Fp. 138—140° Z., d. s. 98% d. Th.

$C_{16}H_{23}N_3OBr_2$	Br ber.: 35,03	Br gef.: 34,51
M. G. 433,19		

L-Lysin-β-Naphthylamid · Dipikrat

0,15 g Dihydrobromid werden in 10 ml H_2O gelöst und mit wäßriger Pikrinsäurelösung gefällt. Das ausgefallene Rohpikrat wird aus Äthanol umkristallisiert. Dabei entstehen Blättchen.

Fp 238—240° Z.

$C_{28}H_{27}N_9O_{15}$	N ber.: 17,28	N gef.: 17,46
M. G. 729,57		

Di-Cbo-L-Ornithin-β-Naphthylamid

3 g Di-Cbo-L-Ornithin (111) 1,12 g β-Naphthylamin und 2,0 g DCCI werden in 10 ml DMFA gelöst. Nach Filtration des Harnstoffs und Nachwaschen mit Äther wird im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit verdünnter HCl und verdünnter $NaHCO_3$-Lösung digeriert, dann 2mal aus Äthanol umkristallisiert.

A: 2,3 g, d. s. 56% d. Th., Fp. 175—177° Z.

$C_{31}H_{31}O_5N_3$	C ber.: 70,83	C gef.: 70,68
	H ber.: 5,95	H gef.: 6,05
M. G. 525,59	N ber.: 8,06	N gef:. 8,01

L-Ornithin-β-Naphthylamid · Monocitrat

2,2 g Di-Cbo-Verbindung wird in der üblichen Weise in HBr-Eisessig (9 ml) gespalten. Das mit Äther ausgefällte Hydrobromid wird in 20 ml CH_3OH gelöst,. mit IRA-400-Austauscher (NH_4^+-Form) bis zur neutralen Reaktion behandelt, dann filtriert und im Vakuum eingedampft. Das resultierende Öl gibt nach Aufnehmen in wenig absolutem Äthanol und Zusatz einer alkoholischen Lösung von p.a. Zitronensäure eine ölige Fällung, die auf Zusatz von Äther kristallisiert.

A: 1,18 g, d. s. 64% d. Th. Fp. 138—140° Z.

$C_{21}H_{27}N_3O_8$	N ber.: 9,35	N gef.: 9,31
M. G. 449,45		

L-Ornithin-β-Naphthylamid · Pikrat

Das Pikrat wird aus der wäßrigen Lösung des Dihydrobromids der Fällung mit wäßriger Pikrinsäurelösung gewonnen. Aus Äthanol-Aceton entstehen Nadeln.

Fp. 226—228° Z.

$C_{27}H_{25}N_9O_{15}$	N ber.: 17,62	N gef.: 17,65
M. G. 715,55		

Von sämtlichen Substraten wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 10^{-2} m hergestellt.

Reagenzien, die bei der Ausführung der Versuche verwendet wurden

Puffer: Als Puffer diente für den Bereich von pH 6,2—7,2 Imidazol-HCl-Puffer, für den Bereich von pH 7,4—9,1 Trisoxymethylaminomethan — kurz Tris — Puffer und für den Bereich von pH 9,3—11,5 Glycin-NaOH-Puffer.

Herstellung der Puffer: (Die Daten hierfür wurden dem „Biochemischen Taschenbuch" (112) entnommen.)

1. Imidazol-Puffer:

   0,2 m Imidazol: 13,62 g pro 1000 ml (pH 8,97). Für jeden pH-Wert werden 25 ml der Stammlöung entnommen, dem gewünschten pH-Wert entsprechende Mengen an n/10 HCl zugegeben und mit Aqua destillata auf 100 ml aufgefüllt. Die genauen Werte sind in den Tabellen S. 30 und 31 angegeben.

2. Tris-Puffer:

   0,2 m Tris 24,3 g pro 1000 ml (pH 10,15) Die einzelnen Pufferlösungen wurden wie unter 1. beschrieben dargestellt.

3. Glycin-NaOH-Puffer:

   0,1 m Glycin-NaOH: 7,505 g Glycin + 5,85 g NaCl pro 1000 ml. Dem in Aqua destillata gelösten Gemisch aus Glycin und NaCl werden dem gewünschten pH-Wert entsprechende Mengen entnommen und mit 0,1 n NaOH auf 100 ml aufgefüllt. Die genauen Werte sind in der Tabelle S. 31 angegeben.

Da wir bei unseren Versuchen mit biologischem Material arbeiteten, mußten die Leitfähigkeiten der Puffer mit der Leitfähigkeit von physiologischer Kochsalzlösung in Übereinstimmung

gebracht werden. Um nun die für die einzelnen Pufferlösungen notwendigen Zusätze an festem NaCl berechnen zu können, wurden die Leitfähigkeiten von 0,1—0,9%iger Kochsalzlösung bestimmt. Folgende Werte wurden ermittelt:

%ige NaCl-Lösung	Leitfähigkeit $[10^{-3}\ \Omega^{-1}]$	Spezifische Leitfähigkeit $[10^{-3}\ \Omega^{-1}\ cm^{-1}]$
0,1	1,15	1,8
0,2	2,32	3,6
0,3	3,4	5,3
0,4	4,5	7,0
0,5	5,5	8,6
0,6	6,5	10,2
0,7	7,4	11,6
0,8	8,4	13,1
0,9	9,4	14,7

Die Leitfähigkeit wurde mit dem Meßgerät „Radiometer - Copenhagen" bestimmt.

Erste Pufferherstellung

	Gewünschter pH-Wert	Zusatz von n/10 HCl auf 100 ml [ml]	pH-Wert nach Zusatz von n/10 HCl	Spezifische Leitfähigkeit $[10^{-3}\Omega^{-1}cm^{-1}]$	NaCl-Zusatz in g auf 100 ml	Spezifische Leitfähigkeit n. NaCl-Zusatz $[10^{-3}\Omega^{-1}cm^{-1}]$	Endgültiger pH-Wert
Imidazol	6,2	42,9	6,18	4,41	0,7	15,3	6,3
Imidazol	6,5	37,8	6,51	3,90	0,73	13,92	6,8
Imidazol	6,8	30,4	6,80	3,15	0,78	14,1	7,0
Imidazol	7,1	21,3	7,08	2,31	0,83	15,45	7,3
Tris	7,2	45,0	7,09	3,82	0,74	14,1	7,6
Tris	7,5	40,6	7,28	3,46	0,76	13,92	7,8
Tris	7,8	34,2	7,57	2,95	0,80	14,1	8,0
Tris	8,1	26,0	8,0	2,26	0,84	13,8	8,3
Tris	8,4	17,5	8,20	1,54	0,88	14,2	8,6
Tris	8,7	10,7	8,31	1,01	0,90	14,2	8,8
Tris	9,0	6,0	8,7	0,54	0,94	14,4	9,1
Physiolog. NaCl-Lösung				14,7			

Zweite Pufferherstellung

Da sich erfahrungsgemäß die pH-Werte durch NaCl-Zugabe in den alkalischen Bereich verschieben, wurden die Ausgangswerte dem mehr sauren Bereich entnommen, dennoch mußten nach NaCl-Zugabe alle pH-Werte mit conc. HCl korrigiert werden.

	Gewünschter pH-Wert	Zusatz von n/10 HCl auf 100 ml [ml]	Spezifische Leitfähigkeit [$10^{-3}\Omega^{-1}cm^{-1}$]	Na-Cl-Zusatz in g auf 100 ml	Spezifische Leitfähigkeit n. NaCl-Zusatz [$10^{-3}\Omega^{-1}cm^{-1}$]	pH-Wert nach NaCl-Zusatz	Endgültiger pH-Wert nach Korrektur mit HCl conc.	Endgültige spezifische Leitfähigkeit [$10^{-3}\Omega^{-1}cm^{-1}$]
Imidazol	6,4	39,8	3,75	0,68	14,53	6,61	6,5	13,90
Imidazol	6,7	33,0	1,70	0,85	15,78	6,92	6,8	15,78
Imidazol	7,1	21,3	2,16	0,77	13,59	7,28	7,2	13,59
Tris	7,3	43,6	3,44	0,73	13,90	7,42	7,4	13,44
Tris	7,6	38,8	3,09	0,75	13,90	7,74	7,7	13,75
Tris	7,9	31,6	2,53	0,76	13,59	8,02	8,0	13,59
Tris	8,2	23,3	1,89	0,78	13,12	8,30	8,3	13,12
Tris	8,5	15,0	1,23	0,86	13,90	8,68	8,6	13,75
Tris	8,7	10,7	0,91	0,88	13,90	9,0	8,8	13,75
Tris	9,0	6,0	0,53	0,9	14,375	9,29	9,0	14,06
Physiolog. NaCl-Lösung			13,75					

Herstellung des Glycin-NaOH-Puffers

	Gewünschter pH-Wert	ml der Stammlösung auf 100 ml	Spezifische Leitfähigkeit	Zusatz von NaCl in g auf 100 ml [$10^{-3}\Omega^{-1}cm^{-1}$]	Endgültige spezifische Leitfähigkeit [$10^{-3}\Omega^{-1}cm^{-1}$]	Endgültiger pH-Wert
Glycin-NaOH-Gemisch	9,4	22,3	9,06	0,37	14,53	9,31
Glycin-NaOH-Gemisch	9,9	36,2	8,44	0,41	14,68	9,79
Glycin-NaOH-Gemisch	10,4	44,8	8,28	0,42	14,375	10,21
Glycin-NaOH-Gemisch	10,9	48,5	8,125	0,43	14,53	10,68
Glycin-NaOH-Gemisch	11,4	50,6	9,06	0,37	14,68	11,56
Physiolog. NaCl-Lösung			14,68			

Thrombin: Das von uns verwendete Thrombin ist das Präparat „Topostasin" der Firma Hoffmann-La Roche. Es ist ein Biothrombin, das aus Rinderblut nach dem Verfahren von Astrup und Darling (113) hergestellt wird. Ein Fläschchen „Topostasin" enthält 3000 N.I.H.-Einheiten Thrombin.

Hirnthrombokinase: Es ist eine Thrombokinase, die nach Quick aus der grauen Substanz von menschlichem Hirn durch Zerreiben mit Aceton und anschließendes Trocknen im Vakuum gewonnen wurde.

Plasmathrombokinase: Nach der Methode von Biggs wird eine Mischung aus $BaSO_4$-Rinderplasma (1 : 5 mit Puffer verdünnt), menschlichem Serum (1 : 10 verdünnt), Chloroform-Hirnextrakt (1 : 100 verdünnt) und $CaCl_2$ bei 37° C bis zum Auftreten maximaler Aktivität, meist 4—5 Minuten, inkubiert, dann ins Eisbad gestellt und sofort verwendet.

Plasmin: Es kam als hochaktives Präparat zur Anwendung, das von Auerswald und Dolleschell am physiologischen Institut in Wien nach einem besonderen Verfahren hergestellt wurde.

Streptokinase: Reagens „Varidase" der Firma Lederle (Stolberg im Rheinland), Präparat zur i.m. Anwendung.

Russell-Vipern-Gift: In dem von uns verwendeten Präparat „Russelli-Toxin zur Prothrombinbestimmung" der Firma Winter (Innsbruck) liegt das Toxin in einer Milchzuckerverreibung vor. In einer Ampulle sind 0,5 mg reines Toxin enthalten.

Diisopropylfluorphosphat (DFP): DFP wurde als Reinsubstanz mit dem Molekulargewicht von 136,17 mit Isopropylalkohol auf die gewünschte Konzentration gebracht.

Aceton: Reagens „Aceton p.a." der Firma Merck (Darmstadt).

Salzsäure: Reagens „Acidum hydrochloricum p.a." der Firma Merck (Darmstadt).

$NaNO_2$: Reagens „Natrium nitrosum p.a." der Firma Merck (Darmstadt).

Trichloressigsäure: 10%ig, p.a. der Firma Merck (Darmstadt).

Ammonsulfamat: Reagens „Ammonium sulfaminicum p.a." der Firma Merck (Darmstadt).

N-(1-Naphthyl)-Äthylendiamin-di-hydrochlorid: Reagens der Firma Eastman-Kodak (Rochester, N.Y., U.S.A.).

β-Naphthylamin: Reagens der Firma Merck (Darmstadt).

Beschreibung der Versuche

Die Methode, die wir für unsere Versuche wählten, entspricht derjenigen, die Tuppy und Nesvadba (104) zur Aktivitätsbestimmung von Oxytocinase angegeben haben. Bei der Spaltung der L-Aminosäure-β-Naphthylamide durch Oxytocinase bzw. Thrombin wird β-Naphthylamin frei; dieses wird in saurer Lösung diazotiert und das Naphthyldiazoniumsalz mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-di-hydrochlorid zu einem blauvioletten Farbstoff gekuppelt, der sich kolorimetrisch nachweisen läßt.

a) Bestimmung der Thrombinaktivität:

2,0 ml Puffer (Imidazol-, Tris- oder Glycin-NaOH-Puffer, je nach dem pH-Wert) werden in einem Wassermannröhrchen mit 1,0 ml Thrombin gemischt. Von dieser Mischung werden in 3 Zentrifugenröhrchen je 0,75 ml pipettiert und mit je 0,25 ml Substratlösung versetzt. Der Inhalt des ersten Röhrchens, welcher zur Bestimmung des Blindwertes dient, wird unmittelbar nach der Substratzugabe zur Verhinderung der Enzymreaktion mit 1,0 ml einer 10%igen Trichloressigsäure (TCA)-Lösung versetzt, und das Röhrchen, mit einem Korkstopfen verschlossen, in den Kühlschranck gestellt bis die enzymatische Reaktion in den beiden anderen Röhrchen beendet ist. Die letzteren — man nimmt deren zwei zur Bestimmung von Doppelwerten — werden, ebenfalls mit Korkstopfen verschlossen, für 24 Stunden in ein Wasserbad von 37° C gebracht und erst dann mit je 1,0 ml einer 10%igen TCA-Lösung versetzt. Man muß die Inkubationszeit

so lang wählen, da erst dann die enzymatische Reaktion abgeschlossen ist (siehe die diesbezüglichen Versuchsergebnisse S. 41—45).

Nach Beendingung der Inkubation werden die Inhalte der 3 Röhrchen in gleicher Weise weiterbehandelt: Man zentrifugiert sie etwa 2 Minuten lang bei 1500 Umdrehungen. Von der klaren, überstehenden Lösung pipettiert man jeweils 1,0 ml in 50 ml-Erlenmeyerkölbchen; dazu gibt man 9,0 ml einer Mischung aus 2 Volumteilen einer 0,36 nHCl und 1 Volumteil Aceton. (Das Aceton dient dazu, daß der entstehende Farbstoff nicht von der Wandung der Erlenmeyerkölbchen adsorbiert werden kann. Aus demselben Grund werden auch vor jedem Versuch die Kölbchen und Korkstopfen mit dem oben erwähnten Salzsäure-Acetongemisch ausgewaschen und mit Aqua destillata nachgespült.

Die nun folgenden Zugaben werden in einer Dunkelkammer bei Rotlichtbeleuchtung gemacht, da das Naphthyldiazoniumsalz sehr lichtempfindlich ist. Dabei müssen die verwendeten Lösungen frisch bereitet sein. Zunächst gibt man 1,0 ml einer 0,1%igen $NaNO_2$-Lösung zu für die Diazotierung des β-Naphthylamins, etwa 3 Minuten später 1,0 ml einer 0,5%igen Lösung von Ammonsulfamat zur Zerstörung von überschüssigem Nitrit und wieder etwa 3 Minuten später 1,0 ml einer 0,1%igen wäßrigen Lösung von N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-di-hydrochlorid und verschließt dann die Kölbchen. Nach jeder einzelnen Zugabe müssen die Lösungen gut gemischt und die Kölbchen verschlossen werden. Nun läßt man bei 37° C und ebenfalls im Dunkeln die Entwicklung des blauvioletten Farbstoffs vor sich gehen. Nach 3—4 Stunden ist die maximale Farbentwicklung erreicht, die dann für etwa 16 Stunden konstant bleibt.

Die kolorimetrische Bestimmung wird mit einem Beckman-Spektrophotometer in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm, bei einer Wellenlänge von 565 mμ und einer Spaltbreite von 0,03 vorgenommen. Aus den abgelesenen Extinktionswerten (Versuchswert minus Blindwert) läßt sich mit Hilfe einer Eichkurve die Menge des durch die enzymatische Reaktion freigesetzten β-Naphthylamins ermitteln. Als Bezugslösung für die Extinktionsmessung der Blindwerte diente die oben beschriebene Salzsäure-Acetonmischung.

Zum Pipettieren der verschiedenen Lösungen wurden Meßpipetten verwendet, mit Ausnahme der Zugabe des Salzsäure-Acetongemisches, bei der mit einer 9 ml-Vollpipette gearbeitet wurde und der Zugaben, die bei Rotlicht gemacht wurden, bei denen 1 ml-Vollpipetten verwendet wurden.

Die Prüfung der Beeinflussung der Blutgerinnung durch unsere Substrate führten wir nach folgenden Methoden durch:

1. Zweistufen-Prothrombinbestimmung nach Seegers (146).
2. Thrombokinasebildungstest nach Biggs und Douglas (147).

b) Aufstellung der Eichkurve (s. Abb. 1).

Hierzu werden je 1,0 ml von β-Naphthylaminlösungen bekannten Gehaltes in 50 ml-Erlenmeyerkölbchen pipettiert und ebenso weiterbehandelt wie oben für die Ferment-Puffer-Substrat-Mischung beschrieben, nachdem 1 ml der nach Zentrifugieren erhaltenen überstehenden Lösung in die Erlenmeyerkölbchen pipettiert wurde.

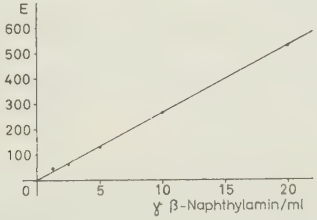


Abb. 1: Eichkurve für die kolorimetrische Bestimmung der Thrombinaktivität

Zur Herstellung der verschieden konzentrierten β-Naphthylaminlösungen wurden 0,02 g β-Naphthylamin in 1000 ml einer 1/1000 nHCl gelöst, so daß in 1 ml Lösung 20 γ β-Naphthylamin enthalten waren. Aus dieser Stammlösung wurde dann die Verdünnungsreihe hergestellt.

Durchschnittliche Extinktionswerte der verschieden konzentrierten β-Naphthylaminlösungen (s. Abb. 1)

β-Naphthylamin [γ/ml]	Extinktions-wert
1,25	45
2,5	68
5,0	130
10,0	266
20,0	530

Allgemeine Bemerkungen zur praktischen Ausführung der Versuche

I. Verfolgt man den zeitlichen Ablauf einer Ferment-Substratreaktion graphisch, so sieht man, daß die Reaktionsgeschwindigkeit allmählich abnimmt und schließlich ganz zum Stillstand kommt. Während der Reaktion finden gewisse Veränderungen im Reaktionsgemisch statt: Substrat verschwindet, die Reaktionsprodukte entstehen, womit die gegenläufige Umsetzung in Gang kommt; außerdem können sich Säuren oder Basen bilden, wodurch sich das pH verändert. Alle Fermente sind in ihrer Reaktion aber abhängig von der Konzentration des Substrates sowie vom pH, und viele werden sogar durch die Produkte der von ihnen katalysierten Reaktion in ihrer Wirksamkeit gehemmt. Um ein verläßliches Maß für die Aktivität eines Fermentes unter gewissen Bedingungen zu erhalten, ist es notwendig, entweder diese Veränderungen im Reaktionsgemisch durch eine entsprechende Korrektur auszugleichen oder sie zu verhindern. Dafür gibt es zwei Verfahren:

1. Es wird die Zeit gemessen, innerhalb derer ein chemischer Umsatz festgelegter Größe stattfindet. Dann ist die Menge verbrauchten Substrates und der gebildeten Produkte, eine etwaige Veränderung des pH und die Größe anderer Umwandlungen von Versuch zu Versuch gleich, so daß die verschiedenen Experimente vergleichbar werden. Die gemessene Zeit ist der Aktivität des Fermentes umgekehrt proportional.

2. Es wird die Größe des chemischen Umsatzes innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalles nach Beginn der Reaktion gemessen. Vorausgesetzt, daß man dieses Intervall genügend kurz hält, sind die Veränderungen in der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches so gering, daß sie praktisch vernachlässigt werden können.

Für unsere Versuche wandten wir in den meisten Fällen das erste Verfahren an und nur in Ausnahmefällen das zweite. Das gewählte Verfahren ist bei den Versuchen jeweils angegeben.

II. Die Substrate wurden meist in Form ihrer Stammlösungen, die alle eine Konzentration von $c = 10^{-2}$m (vgl. S. 29) besaßen, verwendet. Änderungen der Konzentrationen bei einzelnen Versuchen werden besonders vermerkt.

III. Als Folge der verschiedenen Zugaben beim Ablauf eines Versuches entsteht eine erhebliche Verdünnung der anfänglichen Thrombinkonzentration. Die Umrechnung von der Ausgangskonzentration zur Versuchskonzentration geschieht folgendermaßen: Als Beispiel dient dabei die Standardkonzentration von 300 Einheiten Thrombin pro ml.

Die Mischung von 2 ml Puffer und 1 ml Thrombin (300 E/ml) ergibt eine Verdünnung auf 100 E/ml. Diese Konzentration wird durch die Substratzugabe (0,75 ml Pufferthrombinmischung zu 0,25 ml Substrat) um 1/4 verdünnt, so daß 75 E/ml resultieren.

Die Substratkonzentration erleidet eine entsprechende Verdünnung: Die Ausgangskonzentration ist 10^{-2}m, durch die verschiedenen Zugaben wird das Substrat um 1/4 verdünnt, und es entsteht eine Versuchskonzentration von $0{,}25 \cdot 10^{-2}$m.

IV. Wenn in einer Versuchsreihe mehrere Puffer gebraucht wurden, so wurde der Versuchsansatz wie oben beschrieben gemacht. Blieb aber innerhalb eines Versuches der pH-Wert konstant und wurde eine andere Größe variiert, so wurden die für den gesamten Versuchsansatz nötigen Mengen an Puffer und gelöstem Thrombin zusammen in ein Gefäß gegeben und daraus in Wassermannröhrchen je 0,75 ml pipettiert und 0,25 ml Substrat zugegeben.

V. Das Präparat „Topostasin Roche" wurde bei allen Versuchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Thrombinkonzentration gebracht.

VI. Am Beckman-Spektrophotometer bereitete manchmal die Einstellung der Spaltbreite von 0,030 Schwierigkeiten. Die Spaltbreite mußte dann, besonders bei hohen Blindwerten, etwas vergrößert werden. Die Variationsbreite lag zwischen 0,030 und 0,041; die vergrößerte Spaltbreite wird bei den Versuchen jeweils angegeben.

VII. Die Versuche wurden zum größten Teil in nicht siliconisierten Glasgefäßen ausgeführt. Wenn siliconisierte Glasgefäße verwendet wurden, so ist dies besonders vermerkt.

VIII. Es wurde einmal der Versuch gemacht, die Wassermann- und Zentrifugenröhrchen nicht nach dem gewöhnlichen Reinigungsprozeß (siehe unten, IX) zu waschen, sondern mit Teepol. Danach aber zeigten sich außerordentlich geringe und sehr schwankende Extinktionswerte, so daß man annehmen muß, daß das Teepol die Thrombinaktivität nahezu vollständig zerstört. Relativ wenig allerdings wurde die Wirkung von Thrombin auf Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid beeinträchtigt.

IX. Die Reinigung der verwendeten Glasgefäße und Pipetten wurde folgendermaßen vorgenommen: Die Wassermann- und Zentrifugenröhrchen und die Pipetten werden zunächst etwa 24 Stunden in Chromschwefelsäure gelegt, dann mit Wasser ausgespült, für einige Stunden in verdünnte Ammoniaklösung gelegt und mit Aqua destillata nachgespült.

Die Erlenmeyerkölbchen und die zugehörigen Korkstopfen wurden sofort nach jedem Versuch mit der oben beschriebenen Salzsäure-Aceton-Mischung ausgewaschen und mit Aqua destillata gespült.

Folgende Bedingungen wurden für alle Versuche gleichgehalten:

Von pH 6,5— 7,2 wurde Imidazol-Puffer,
von pH 7,4— 9,1 wurde Tris-Puffer und
von pH 9,4—11,6 wurde Glycin-NaOH-Puffer verwendet.

Die Wasserbadtemperatur wurde jeweils während der gesamten Inkubationszeit auf 37° C gehalten.

Thrombin-Versuchskonzentration = 1/4 Thrombin-Ausgangskonzentration

Substrat-Versuchskonzentration = 1/4 Substrat-Ausgangskonzentration

$= 0{,}25 \cdot 10^{-2}$m

Wurde eine andere Substrat-Ausgangskonzentration als 10^{-2}m verwendet, so wird dies besonders vermerkt.

Wirkung des Thrombins auf die synthetischen Substrate

Einfluß des pH-Wertes

Bei der Ausführung dieser Versuche zeigte sich, daß die Blindwerte zwar von Substrat zu Substrat verschieden, aber von den pH-Werten weitgehend unabhängig waren, so daß für die Untersuchung jedes Substrates die Bestimmung von 2 Blindwerten genügte.

Tosyl-L-Argenin-β-Naphthylamid (Abb. 2)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2}m
Versuchskonzentration: 0,25 · 10^{-2}m
Inkubationszeit: 24 Stunden.

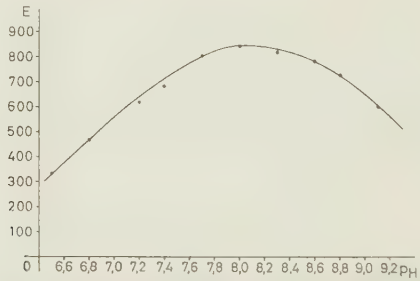


Abb. 2: Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktion zwischen Thrombin und Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; Puffer: Imidazol- und Tris-Puffer

Durchschnittliche Extinktionswerte

pH	Versuchswert minus Blindwert von 25
6,5	330
6,8	463
7,2	615
7,4	679
7,7	800
8,0	840
8,3	815
8,6	780
8,8	723
9,1	600

Der optimale pH-Wert liegt also bei pH 8,0

L-Arginin-β-Naphthylamid

a) *Thrombin:* Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2}m
Versuchskonzentration: 0,25 · 10^{-2}m
Inkubationszeit: 24 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

pH	Versuchswert minus Blindwert von 30
6,5	1265
6,8	1677
7,2	1880
7,4	> 2000
7,7	> 2000
8,0	> 2000
8,3	> 2000
8,6	1815
8,8	1320
9,1	1225

Der optimale pH-Wert konnte hier nicht bestimmt werden, weil die Werte am Spektrophotometer nicht mehr genau ablesbar waren.

Für den folgenden Versuch wurde das Substrat L-Arginin-β-Naphthylamid frisch hergestellt und für alle weiteren Versuche in dieser Form benutzt.
b) (Abb. 3).
Thrombin: Ausgangskonzentration: 60 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 15 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2}m
Versuchskonzentration: 0,25 · 10^{-2}m
Inkubationszeit: 24 Stunden.

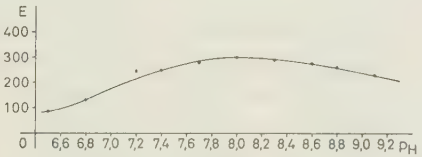


Abb. 3: Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 60 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzenaration: 10^{-2} m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; Puffer: Imidazol- und Tris-Puffer

Durchschnittliche Extinktionswerte

pH	Versuchswert minus Blindwert von 2
6,5	198
6,8	230
7,2	250
7,4	273
7,7	234
8,0	228
8,3	163
8,6	95
8,8	60
9,1	35

Der optimale pH-Wert liegt also bei pH 7,4.

Eine für die Auswertung der Versuche wichtige Beobachtung ist die, daß sich bei Verwendung des Substrates L-Arginin-β-Naphthylamid bei einer Thrombinkonzentration von 300 N.I.H.-Einheiten pro ml und einem pH von 7,4 Extinktionswerte von mehr als 2000 ergaben. Später, mit dem Altwerden des Substrates, nahmen die Extinktionswerte unter denselben Bedingungen immer mehr ab (s. S. 42, 43, 44, 47, 49, 55, 57, 58). Diese Beobachtung wurde bei den andern Substraten nicht gemacht, da diese häufiger frisch hergestellt wurden. Ob hierbei eine Zunahme des Bodenkörpers oder die Alterung des Substrates maßgebend ist, muß erst in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

L-Ornithin-β-Naphthylamid (Abb. 4)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangkonzentration: 10^{-2} m
Versuchskonzentration: $0{,}25 \cdot 10^{-2}$ m

Durchschnittliche Extinktionswerte

pH	Versuchswert minus Blindwert von 5
6,5	20
6,8	28
7,2	36
7,7	43
8,0	47
8,3	59
8,6	66
8,8	73
9,1	80

Da in dem Bereich von pH 6,5—9,1 die Extinktionswerte kontinuierlich anstiegen und kein pH-Optimum ermittelt werden konnte, wurde außerdem noch der Bereich bis pH 11,6 getestet. Bei dieser Untersuchung wurden Thrombinkonzentration und Inkubationszeit wieder gleich gewählt, nur die Wasserbadtemperatur wurde statt auf 37° C versehentlich auf 36° C eingestellt, so daß die Extinktionswerte durchweg etwas zu tief liegen.

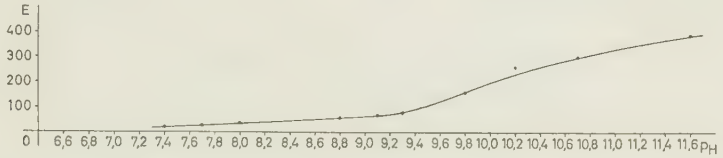


Abb. 4: Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Ornithin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml; Temperatur: 36° C; Inkubationszeit: 24 Stunden; Puffer: Tris- und Glycin-NaOH-Puffer; Substratkonzentration: 10^{-2} m

Durchschnittliche Extinktionswerte

pH	Versuchswert minus Blindwert von 7
7,4	19
7,7	26
8,0	34
8,8	57
9,1	66
9,3	76
9,8	157
10,2	256
10,7	299
11,6	386

Auch bei diesem Versuch zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Extinktionswerte. Um dieses eigentümliche Verhalten zu ergründen, wurde L-Ornithin-β-Naphthylamid ohne Zusatz von Thrombin in zwei Versuchen, einmal mit Pufferlösung von pH 8,7 und einmal mit Pufferlösung von pH 11,6 zusammengegeben. Die Versuche wurden im übrigen wie üblich durchgeführt. Bei der Probe mit der Pufferlösung von pH 8,7 ergab sich ein Extinktionswert von 89 und bei derjenigen mit der Pufferlösung von pH 11,6 ein Extinktionswert von 790. Dies deutet darauf hin, daß die Säureamidbindung des Substrates durch zunehmende Alkalität der Pufferlösung unter Spaltung des Moleküls gelöst wird. L-Ornithin-β-Naphthylamid ist daher als Substrat nicht zu verwerten.

L-Lysin-β-Naphthylamid (In der Dihydrobromidform) (Abb. 5)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 250 N.I.H.-E/ml

Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2} m
Versuchskonzentration: $0{,}25 \cdot 10^{-2}$ m

Inkubationzeit: 24 Stunden.

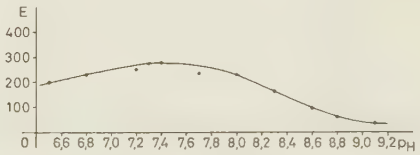


Abb. 5: Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Lysin-β-Naphthylamid (als Dihydrobromid). — Thrombin-Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; Puffer: Imidazol- und Tris-Puffer

Durchschnittliche Extinktionswerte

pH	Versuchswert minus Blindwert von 14
6,5	86
6,8	130
7,2	244
7,4	251
7,7	280
8,0	299
8,3	292
8,6	274
8,8	258
9,1	229

Der optimale pH-Wert liegt bei pH 8,0.

Bei allen Versuchen, bei denen L-Lysin-β-Naphthylamid als Substrat diente, wurde als optimaler pH-Wert pH 7,7 benutzt, da erst am Schluß der Untersuchungen die exakte pH-Abhängigkeitskurve ermittelt wurde.

L-Lysin-β-Naphthylamid wird von Thrombin nur sehr langsam angegriffen, daher mußte die Thrombinausgangskonzentration so hoch (1000 N.I.H.-E/ml) gewählt werden. Außerdem ging aus unseren Untersuchungen hervor, daß L-Lysin-β-Naphthylamid in der Dihydrobromidform besser gespalten wird als in der Zitratform. So ergibt sich mit einer Ausgangskonzentration von 300

N.I.H.-Einheiten Thrombin pro ml und einem pH von 7,7 mit der Dihydrobromidform ein Extinktionswert von 74 und mit der Citratform unter denselben Bedingungen ein Extinktionswert von 16.

Einfluß der Inkubationszeit auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten

Bei diesen Versuchen wurde für jedes Substrat der inzwischen ermittelte optimale pH-Wert eingesetzt.

Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid (Abb. 6)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml

Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2} m
Versuchskonzentration: $0{,}25 \cdot 10^{-2}$ m

pH-Wert: pH opt. 8,0.

Versuchsansatz: 10 ml einer Thrombinlösung mit 300 N.I.H.-Einheiten pro ml wurden mit 20 ml Tris-Puffer (pH 8,0) gemischt; daraus wurden je 0,75 ml in Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 0,25 ml Substrat versetzt.

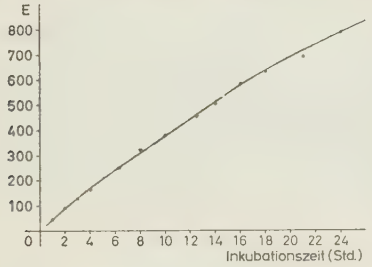


Abb. 6: Einfluß der Inkubationszeit auf die Reaktion zwischen Thrombin und Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Temperatur: 37 ° C; pH 8,0 (Tris-Puffer)

Durchschnittliche Extinktionswerte

Inkubationszeit [Std.]	Versuchswert minus Blindwert von 15
1	46
2	88
3	129
4	167
$6^1/_4$	248
8	326
10	384
$12^1/_2$	457
14	506
16	583
18	637
21	691
24	789

L-Arginin-β-Naphthylamid (Abb. 7)

Mit diesem Substrat, das sich bisher als das empfindlichste erwiesen hatte, führten wir verschiedene Versuche in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aus, um die Reaktionen zwischen Thrombin und diesem Substrat möglichst genau kennen zu lernen.

a) Zunächst prüften wir den Reaktionsablauf innerhalb von 24 Stunden in Intervallen von 1 Stunde.

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml

Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2} m
Versuchskonzentration: $0{,}25 \cdot 10^{-2}$ m

pH-Wert: pH opt. 7,4.

Versuchsansatz: 10 ml einer Thrombinlösung von 300 N.I.H.-Einheiten pro ml wurden mit 20 ml Tris-Puffer (pH 7,4) gemicht; daraus wurden je 0,75 ml in Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 0,25 ml Substrat versetzt.

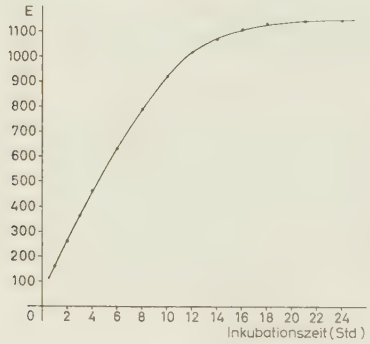


Abb. 7: Einfluß der Inkubationszeit auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Temperatur: 37° C; pH 7,4 (Tris-Puffer)

Durchschnittliche Extinktionswerte

Inkubationszeit [Std.]	Versuchswert minus Blindwert von 5
1	159
2	261
3	362
4	461
6	632
8	790
10	920
12	1015
14	1068
16	1105
18	1130
21	1138
24	1144

b) (Abb. 8).

Bei diesem Versuch legten wir besonderen Wert auf den Reaktionsablauf innerhalb der ersten 120 Minuten.

Thrombin: Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 250 N.I.H.-E/ml

Substrat: Ausgangskonzentration: $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ m
Versuchskonzentration: $0{,}125 \cdot 10^{-2}$ m

Das Substrat wurde 1 : 1 mit Aqua destillata verdünnt verwendet, da es in dieser Konzentration die optimale Empfindlichkeit gegenüber Thrombin aufweist (s. S. 47).

pH-Wert: pH opt. 7,4.

Versuchsansatz: 8,5 ml einer Thrombinlösung mit 1000 N.I.H.-Einheiten pro ml wurden mit 17 ml Tris-Puffer (pH 7,4) und 8,5 ml L-Arginin-β-Naphthylamid in einer Konzentration von $c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$ m in einem siliconisierten 50-ml-Erlenmeyerkölbchen gemischt und im Wasserbad von 37° C inkubiert. Bei diesem Versuch wurde ein siliconisiertes Erlenmeyerkölbchen verwendet, damit bei den so kurzen Inkubationszeiten der Verlust an Thrombinaktivität möglichst gering gehalten werden konnte.

Die weitere Behandlung des Gemisches nach der Inkubation wurde wie üblich ausgeführt, und dabei wurden wieder gewöhnliche Glasgefäße benutzt.

Bei diesen Extinktionswerten ist zu beachten, daß sie trotz des siliconisierten Glasgefäßes, das für den Versuchsansatz verwendet wurde, gegenüber früheren Versuchen, die unter denselben Bedingungen ausgeführt wurden, niedriger sind, daß also die Empfindlichkeit des Substrates abgenommen hat (vgl. S. 38).

Durchschnittliche Extinktionswerte

Inkubationszeit [Min.]	Versuchswert minus Blindwert von 7	Inkubationszeit [Std.]	Versuchswert minus Blindwert von 7
10	64	1	282
20	106	2	480
30	154	16	835
40	197	20	857
50	242	24	883
60	282		
70	320		
80	357		
90	386		
100	430		
110	454		
120	480		

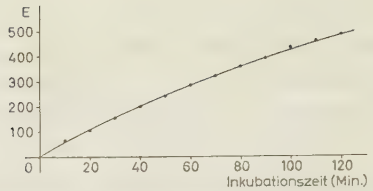


Abb. 8: Einfluß der Inkubatiosnzeit auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ m; Temperatur: 37° C; pH 7,4 (Tris-Puffer)

c) (Abb. 9).

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde zu dem Rest des unter 2b) beschriebenen Reaktionsgemisches neuerlich Substrat zugegeben, und zwar auf 4 ml Reaktionsgemisch 1 ml Substrat, so daß in der Mischung statt 250 N.I.H.-Ein-

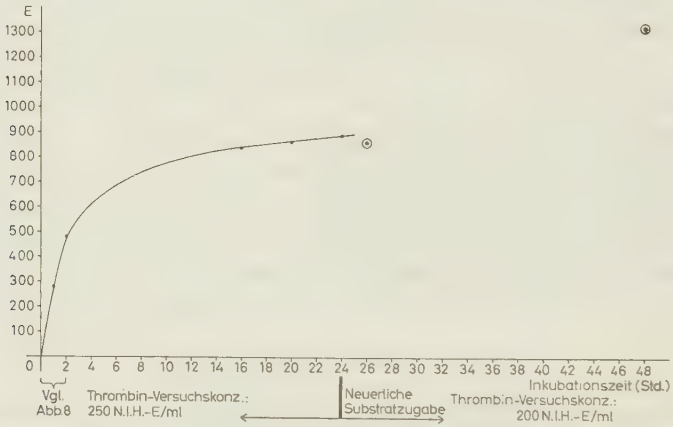


Abb. 9: Einfluß der Inkubationszeit auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E ml; Substrat-Ausgangskonzentration: $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ m; Temperatur: 37° C; pH 7,4 (Tris-Puffer)

heiten Thrombin pro ml nur noch 200 N.I.H.-Einheiten Thrombin pro ml enthalten waren. Diese Mischung wurde inkubiert und in der üblichen Weise weiterbehandelt.

Es ergaben sich folgende Extinktionswerte:

Inkubationszeit [Std.]	Versuchswert minus Blindwert von 7
2	855
24	1310

Es zeigt sich also, daß ein Wiedereinestzen der Thrombinwirkung möglich ist, was wohl durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Ferment, Substrat und Spaltprodukten erklärt werden kann.

L-Lysin-β-Naphthylamid (in der Dihydrobromidform) (Abb. 10)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 250 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2} m
Versuchskonzentration: $0{,}25 \cdot 10^{-2}$ m
pH-Wert: 7,7

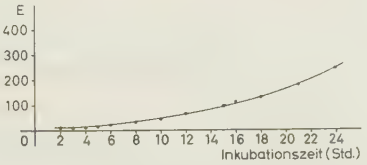


Abb. 10: Einfluß der Inkubationszeit auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Lysin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Temperatur: 37° C; pH 7,7 (Tris-Puffer)

Versuchsansatz: 10 ml einer Thrombinlösung mit 1000 N.I.H.-Einheiten pro ml wurden mit 20 ml Tris-Puffer (pH 7,7) gemischt; daraus wurden je 0,75 ml in Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 0,25 ml Substrat gemischt.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Inkubationszeit [Std.]	Versuchswert minus Blindwert von 2
1	—
2	6
3	5
4	9
6	20
8	31
10	46
12	65
15	95
16	108
18	130
21	177
24	244

Einfluß verschiedener Substratkonzentrationen auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten

Es wurden Substratverdünnungen von 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 7 mit Aqua destillata hergestellt.

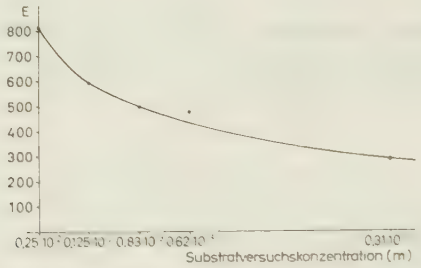


Abb. 11: Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktion zwischen Thrombin und Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; pH 8,0 (Tris-Puffer)

Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid (Abb. 11)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2} m
pH-Wert: pH opt. 8.0
Inkubationszeit: 24 Stunden

Durchschnittliche Extinktionswerte

Substrat-konzentration im Versuch	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert	Prozentuelle Spaltung
0,25 · 10^{-2}m	15	812	19 %
0,125 · 10^{-2}m	9	592	27,8%
0,83 · 10^{-3}m	9	497	35 %
0,62 · 10^{-3}m	8	475	44,5%
0,31 · 10^{-3}m	6	281	52 %

Die prozentuelle Spaltung des Substrates nimmt mit zunehmender Verdünnung desselben entsprechend zu. Die absolute freigesetzte Menge an β-Naphthylamin ist bei Verwendung der Stammlösung des Substrates am höchsten.

L-Arginin-β-Naphthylamid (Abb. 12)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 60 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 15 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2} m
pH-Wert: pH opt. 7,4
Inkubationszeit: 24 Stunden

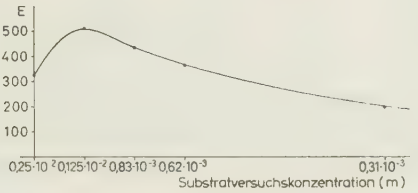


Abb. 12: Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 60 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; pH 7,4 (Tris-Puffer)

Durchschnittliche Extinktionswerte

Substratkonzentration im Versuch	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert	Prozentuelle Spaltung
0,25 · 10^{-2}m	3	325	7,6%
0,125 · 10^{-2}m	3	508	27,0%
0,83 · 10^{-3}m	4	433	30,0%
0,62 · 10^{-3}m	6	363	33,8%
0,31 · 10^{-3}m	2	195	36,3%

Die prozentuelle Spaltung des Substrates nimmt mit Verdünnung desselben entsprechend zu. Die absolute freigesetzte Menge an β-Naphthylamid ist jedoch bei Verwendung des 1 : 1 verdünnten Substrates am größten.

L-Lysin-β-Naphthylamid (Abb. 13)

Thrombin: Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 250 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2} m
Inkubationszeit: 24 Stunden
pH-Wert: 7,7

Durchschnittliche Extinktionswerte

Substrat-konzentration im Versuch	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert	Prozentuelle Spaltung
0,25 · 10^{-2}m	3	270	6,4%
0,125 · 10^{-2}m	2	186	8,7%
0,83 · 10^{-3}m	4	137	9,5%
0,62 · 10^{-3}m	3	117	10,9%
0,31 · 10^{-3}m	7	59	11,0%

Die prozentuelle Spaltung des Substrates nimmt mit zunehmender Verdünnung entsprechend zu. Die absolute freigesetzte Menge an β-Naphthylamin ist bei Verwendung der Stammlösung des Substrates am höchsten.

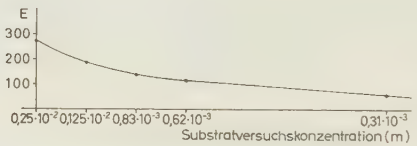


Abb. 13: Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Lysin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 1000 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; pH 7,7 (Tris-Puffer)

Einfluß verschiedener Thrombinkonzentrationen auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten

Die Ausgangskonzentrationen von Thrombin wurden folgendermaßen hergestellt:

1000 N.I.H.-E/ml: 1 Fläschchen „Topostasin Roche" wird in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

500 N.I.H.-E/ml: 1 ml von 1000 N.I.H.-E/ml + 1 ml physiolog. NaCl-Lösung
250 N.I.H.-E/ml: 0,5 ml von 1000 N.I.H.-E/ml + 1,5 ml physiolog. NaCl-Lösung
100 N.I.H.-E/ml: 0,5 ml von 1000 N.I.H.-E/ml + 4,5 ml physiolog. NaCl-Lösung
50 N.I.H.-E/ml: 0,5 ml von 500 N.I.H.-E/ml + 4,5 ml physiolog. NaCl-Lösung
10 N.I.H.-E/ml: 0,5 ml von 100 N.I.H.-E/ml + 4,5 ml physiolog. NaCl-Lösung
5 N.I.H.-E/ml: 0,1 ml von 500 N.I.H.-E/ml + 9,9 ml physiolog. NaCl-Lösung
1 N.I.H.-E/ml: 0,1 ml von 1000 N.I.H.-E/ml + 99,9 ml physiolog. NaCl-Lösung

Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid (Abb. 14)

Thrombinausgangskonzentrationen: s. Tabelle S. 48.
Substratausgangskonzentration: 10^{-2}m
pH-Wert: pH opt. 8.0.
Inkubationszeit: 24 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Thrombinausgangs-konzentration [N.I.H.-E/ml]	Thrombin-konzentration im Reaktionsgemisch [N.I.H.-E/ml]	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
1	0,25	12	5
5	1,25	13	6
10	2,5	14	8
50	12,5	16	98
100	25,0	13	280
250	62,5	14	676
500	125,0	13	1250
1000	250,0	14	2000

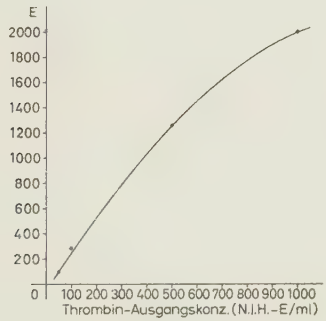


Abb. 14: Einfluß der Thrombinkonzentration auf die Reaktion zwischen Thrombin und Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid. — Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2} m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; pH 8,0 (Tris-Puffer)

L-Arginin-β-Naphthylamid (Abb. 15 und 16)

Mit diesem Substrat führten wir zwei Versuche mit unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen durch.

a) *Thrombinausgangskonzentration:* s. Tabelle S. 48.
Substrat: Ausgangskonzentration: 0,5 · 10^{-2}m
Versuchskonzentration: 0,125 · 10^{-2}m
Inkubationszeit: 6 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Thrombinausgangs-konzentration [N.I.H.-E/ml]	Thrombin-konzentration im Reaktionsgemisch [N.I.H.-E/ml]	Versuchswert minus Blindwert von 11
1	0,25	—
5	1,25	—
10	2,5	6
50	12,5	123
100	25,0	265
250	62,5	553
500	125,0	712
1000	250,0	776

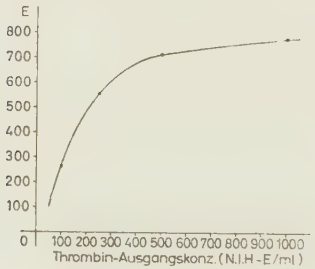


Abb. 15: Einfluß der Thrombinkonzentration auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Arginin-β-Naphthylamid. — Substrat-Ausgangskonzentration: $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ m; Inkubationszeit: 6 Stunden; Temperatur 37° C; pH 7,4 (Tris-Puffer)

b) *Thrombinausgangskonzentration:* s. Tabelle S. 48.
Substrat: Ausgangskonzentration: 0,5 $\cdot 10^{-2}$m
Versuchskonzentration: $0{,}125 \cdot 10^{-2}$m
pH-Wert: pH opt. 7,4.
Inkubationszeit: 24 Stunden.

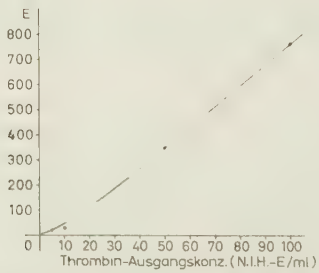


Abb. 16: Einfluß der Thrombinkonzentration auf die Reaktion zwischen Thrombin und L-Arginin-β-Naphthylamid. — Substrat-Ausgangskonzentration: $0{,}5 \cdot 10^{-2}$m; Inkubationszeit: 24 Stunden; Temperatur: 37° C; pH 7,4 (Tris-Puffer)

Durchschnittliche Extinktionswerte

Thrombinausgangs-konzentration [N.I.H.-E/ml]	Thrombin-konzentration im Reaktionsgemisch [N.I.H.-E/ml]	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
1	0,25	1	7
5	1,25	1	17
10	2,5	2	28
50	12,5	2	349
100	25,0	1	760

L-Lysin-β-Naphthylamid

Dieser Versuch wurde für L-Lysin-β-Naphthylamid nicht durchgeführt.

Beeinflussung der Blutgerinnung durch unsere synthetischen Substrate

Einfluß auf die II. Phase der Gerinnung

Methodik: 0,1 ml einer 0,2%igen Lösung von gereinigtem Rinderfibrinogen wurden mit 0,1 ml destilliertem Wasser oder 0,1 ml der Lösungen der synthetischen Substrate in verschiedenen Konzentrationen versetzt und mit 0,2 ml Thrombin in verschiedenen Konzentrationen zur Gerinnung gebracht.

Ergebnis: In keiner der untersuchten Konzentrationen der synthetischen Substrate Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid, L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Lysin-β-Naphthylamid konnte eine sichere Beeinflussung des Ablaufs der II. Phase der Gerinnung nachgewiesen werden.

Einfluß auf die I. Phase der Gerinnung (Abb. 17, 18, 19)

Zum Studium der Wirkung der synthetischen Substrate auf die Thrombinbildung wurde die 2-Phasen-Prothrombinbestimmung nach Seegers gewählt. Bei dieser Methode wird Plasma als Quelle des Prothrombin so verdünnt, daß die Endkonzentration ungefähr eine Einheit (Pro-)Trombin pro ml beträgt. Dieses verdünnte Plasma wird mit verdünntem adsorbiertem Rinderserum als Quelle von Faktor V, Lungenthrombokinase und Calcium inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wird dieser Inkubationsmischung ein Anteil entnommen und an Fibrinogen bestimmt, wieviel Thrombin entstanden ist. Jeweils 0,4 ml der verschieden konzentrierten synthetischen Substrate wurden Lösungen der Inkubationsmischung zugesetzt.

Ergebnis: Die konzentrierten Lösungen ($c = 10^{-2}$m) der geprüften Substrate hemmten die Thrombinbildung vollkommen. In verdünnten Lösungen ($c = 0{,}33 \cdot 10^{-2}$m, $c = 1{,}67 \cdot 10^{-3}$m, $c = 1{,}11 \cdot 10^{-3}$m) verzögerten sie die Thrombinbildung, und in noch stärkerer Verdünnung ($c = 10^{-3}$m) waren sie wirkungslos.

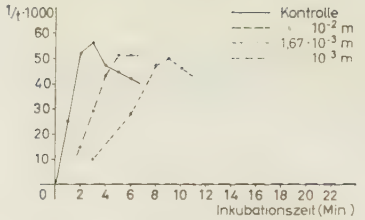


Abb. 17: Einfluß von Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid auf die I. Phase der Blutgerinnung. — Methodik: 2-Stufen-Prothrombinbsetimmung nach Seegers

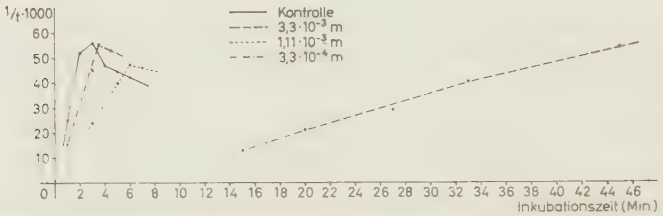


Abb. 18: Einfluß von L-Arginin-β-Naphthylamid auf die I. Phase der Blutgerinnung. Methodik: 2-Stufen-Prothrombinbestimmung nach Seegers

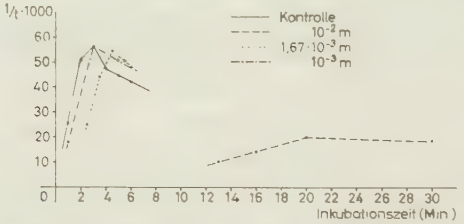


Abb. 19: Einfluß von L-Lysin-β-Naphthylamid auf die I. Phase der Blutgerinnung Methodik: 2-Stufen-Prothrombinbestimmung nach Seegers

Einfluß auf die Vorphase der Gerinnung (Abb. 20, 21, 22)

Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des Thrombokinase-Bildungs-Testes nach Biggs und Douglas (147) ausgeführt. Bei dieser Methode werden $Al(OH)_3$ adsorbiertes, 1 : 5 mit Veronalpuffer von pH 7,3 verdünntes Plasma, 1 : 10 mit Veronalpuffer verdünntes Serum, eine Phospholipidsuspension aus Hirn und Calcium inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wird ein entsprechender Anteil der Inkubationsmischung entnommen und an thrombozytenfreiem Normalplasma auf seine gerinnungsauslösende Aktivität geprüft. 0,1 ml der verschieden konzentrierten Lösungen der zu testenden Substrate wurden zu insgesamt 1,2 ml Inkubationsmischung zugesetzt.

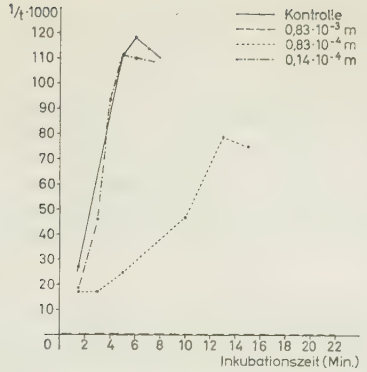


Abb. 20: Einfluß von Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid auf die Vorphase der Blutgerinnung. Methodik: Thrombokinasebildungstest nach Biggs und Douglas

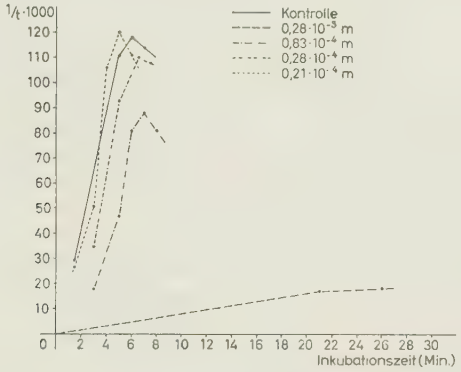


Abb. 21: Einfluß von L-Arginin-β-Naphthylamid auf die Vorphase der Blutgerinnung Methodik: Thrombokinasebildungstest nach Biggs und Douglas

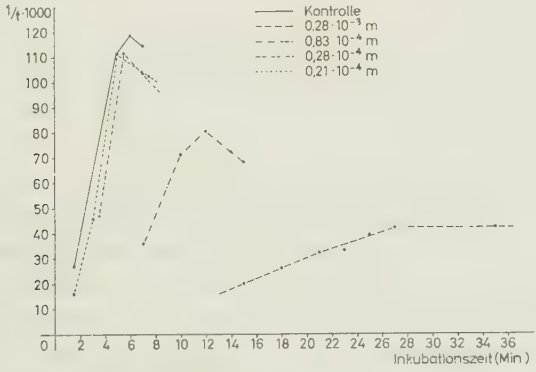


Abb. 22: Einfluß von L-Lysin-β-Naphthylamid auf die Vorphase der Blutgerinnung Methodik: Thrombokinasebildungstest nach Biggs und Douglas

Ergebnis: Die konzentrierten Lösungen ($c = 10^{-2}$m) von Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Arginin-β-Naphthylamid hemmten die Thrombokinasebildung vollkommen; L-Lysin-β-Naphthylamid hemmte ebenfalls sehr deutlich, war aber weniger aktiv als die beiden erstgenannten Substrate. Mit Verdünnung der Substrate wurde die Wirkung geringer und hörte auf bei einer Ausgangskonzentration von $c = 10^{-3}$m entsprechend einer Versuchskonzentration von $c = 0{,}83 \cdot 10^{-3}$m, da beim Thrombokinasebildungstest das Substrat im Verhältnis 1 : 12 verdünnt wird.

Einfluß von Diisopropylfluorphosphat (DFP) auf die Reaktion zwischen Thrombin und unseren synthetischen Substraten

DFP als 10^{-3} molare Lösung (Ausgangskonzentration)

Die 10^{-3} molare DFP-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: Von der Reinsubstanz mit dem Molekulargewicht von 136,17 wurde ein Tropfen auf der Analysenwaage ausgewogen. Der Tropfen, der ein Gewicht von 0,0262 g hatte, wurde in einem Meßkolben auf 200 ml mit Isopropylalkohol verdünnt, wobei sich also eine ungefähr 10^{-3} molare Lösung ergab.

Für den Versuch wurden folgende Thrombin- und Substrat-Ausgangskonzentrationen und pH-Werte verwendet:

Substrat	Thrombinausgangskonzentration [N.I.H.-E/ml]	pH
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$ m)	300	8,0
L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$ m)	300	7,4
L-Lysin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$ m)	1000	7,7

Inkubationszeit: 24 Stunden.

Versuchsansatz: Die Inkubationsmischung wurde zunächst wie üblich bereitet (0,75 ml Thrombin-Puffergemisch + 0.25 ml Substrat). Dazu wurden nun in ein Röhrchen 0,1 ml der 10^{-3} molaren DFP-Lösung und in ein Vergleichsröhrchen 0,1 ml Isopropylalkohol gegeben. Als Kontrollwert wurde eine Probe mit der üblichen Inkubationsmischung mitgeführt.

Da im Versuchsansatz auf 1 ml Inkubationsmischung 0,1 ml DFP-Lösung kommt, wird letztere noch um das 10fache verdünnt, so daß sie im Reaktionsgemisch als 10^{-4} molare Lösung vorliegt.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Substrat	Probe	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert	Hemmung %
Tysol-L-Arginin-β-Naphthylamid	Normalprobe	16	830	
	Mit Isopropylalkohol	16	1000	79,9
	Mit DFP	19	201	
L-Arginin-β-Naphthylamid	Normalprobe	3	770	
	Mit Isopropylalkohol	4	806	67,7
	Mit DFP	6	263	
L-Lysin-β-Naphthylamid	Normalprobe	5	260	
	Mit Isopropylalkohol	6	180	32,23
	Mit DFP	6	122	

DFP vermag in einer Konzentration von c = 10^{-4} m im Reaktionsgemisch die Thrombinwirkung nicht vollständig zu hemmen. Am meisten wird die Wirkung von Thrombin auf Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid mit 79,9% gehemmt, dann folgt die Wirkung auf L-Arginin-β-Naphthylamid mit 67,7% und schließlich die Wirkung auf L-Lysin-β-Naphthylamid mit 32,2%.

Auffallend bei dieser Untersuchung ist, daß die Proben, bei denen Isopropylalkohol zugesetzt wurde, viel höhere Extinktionswerte aufweisen als die Normalproben. Dies rührt daher, daß die Substrate in Isopropylalkohol besser löslich sind als in Wasser und daher von Thrombin leichter angegriffen werden können.

DFP als 10^{-2} molare Lösung (Ausgangskonzentration) und seine Wirkung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Abb. 23)

Die 10^{-2} molare DFP-Lösung wurde analog der oben beschriebenen 10^{-3} molaren hergestellt. In der Reaktionsmischung wird die 10^{-2} molare Lösung als 10^{-3} molare wirksam.

Substrat: Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid
Ausgangskonzentration: 10^{-2}m
Versuchskonzentration: 0,25 · 10^{-2}m

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml

pH-Wert: pH opt. 8,0.

Versuchsansatz: Wie unter 1. beschrieben.

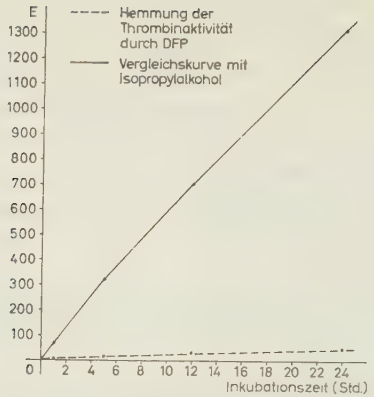


Abb. 23: Einfluß von DFP auf die Reaktion zwischen Thrombin und Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid. — Thrombin-Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml; Substrat-Ausgangskonzentration: 10^{-2}m, Temperatur: 37° C; pH 8,0 (Tris-Puffer)

Durchschnittliche Extinktionswerte

Inkubationszeit [Std.]	Blindwert		Versuchswert minus Blindwert		Hemmung %
	Probe mit Isopropyl-alkohol	Probe mit DFP	Probe mit Isopropyl-alkohol	Probe mit DFP	
1			70	3	95,6
5			322	15	95,3
12			701	32	95,4
24	22	20	1312	47	96,4

Aus diesem Versuch geht hervor, daß DFP, wenn es in der Reaktionsmischung als 10^{-3} molare Lösung vorliegt, die Wirkung von Thrombin nahezu vollständig aufhebt.

Prüfung von zwei weiteren synthetischen Substraten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Thrombin

L-Tyrosin-β-Naphthylamid

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml
Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2}m
Versuchskonzentration: 0,25 · 10^{-2}m
Inkubationszeit: 26 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Spaltbreite: 0,035.

Blindwert	Versuchswert minus Blindwert	pH
6	25	7,4
5	3	8,7

L-Tyrosin-β-Naphthylamid wird nach diesem Befund von Thrombin praktisch nicht angegriffen.

Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid

Zum Vergleich wurden mit diesem Substrat unter denselben Bedingungen die bisher geprüften Substrate Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid, L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Lysin-β-Naphthylamid getestet.

Thrombin: Ausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml
Versuchskonzentration: 75 N.I.H.-E/ml

Substrat: Ausgangskonzentration: 10^{-2}m
Versuchskonzentration: 0,25 · 10^{-2}m

pH-Wert: pH 7,7.

Inkubationszeit: 24 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Spaltbreite: 0,041.

Substrat	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid (c = 10^{-2} m) (frisches Substrat)	6	1800
L-Arginin-β-Naphthylamid (c = 0,5 · 10^{-2} m) (altes Substrat)	6	795
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid (c = 10^{-2} m) (frisches Substrat)	19	1000
L-Lysin-β-Naphthylamid (c = 10^{-2} m)	5	51

Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid ist für Thrombin ein äußerst empfindliches Substrat. Weitere Ausführungen über die Möglichkeiten seiner Verwendung als Substrat für Thrombin sind in der „Diskussion" S. 70 dargestellt.

Vergleich zwischen der Wirkung von Thrombin auf synthetische Substrate in gewöhnlichen Glasröhrchen und in siliconisierten Glasröhrchen

Für diesen Versuch wurden die Substrate L-Arginin-β-Naphthylamid und Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid verwendet.

Mit folgenden Ausgangskonzentrationen von Thrombin, von den Substraten und mit folgenden pH-Werten wurde gearbeitet:

Substrat	Thrombinausgangs-konzentration [N.I.H.-E/ml]	pH
L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$ m)	60	7,4
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$ m)	300	8,0

Durchschnittliche Extinktionswerte

Spaltbreite: 0,035.

Substrat	Normalröhrchen		Siliconröhrchen	
	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
L-Arginin-β-Naphthylamid	4	446	6	500
Tysol-L-Arginin-β-Naphthylamid (Substrat verunreinigt)	112	520	nicht geprüft	665 (abgezogen Blindwert von 112)

Aus den Ergebnissen sieht man, daß gewöhnliches Glas einen Teil der Thrombinaktivität adsorbiert.

Wirkung anderer Fermente des Gerinnungssystems und des fibrinolytischen Systems auf synthetische Substrate

Da im Zusammenhang mit Blutgerinnung und Fibrinolyse außer dem Thrombin noch andere proteolytische Fermente eine Rolle spielen, erschien es wesentlich zu prüfen, wie sich diese zu den von uns untersuchten synthetischen Substraten verhalten. Hierfür kommen in Frage: Die das Thrombin aktivierenden Thrombokinasen, ferner das fibrinolytische Ferment Plasmin, die mit der Aktivierung des fibrinolytischen Fermentes in Beziehung stehenden Fibrinokinasen und Fibrinolysokinasen und außerdem die in die Blutgerinnung eingreifenden proteolytisch aktiven Schlangengifte.

Thrombokinase

Es ist keineswegs gesichert, ob die Thrombokinase ein Ferment ist oder nicht. Die proteolytische Aktivität des thrombokinaseähnlichen Schlangengiftes legte eine diesbezügliche Untersuchung des endogenen Prothrombinumwandlungsfaktors und der Hirnthrombokinase nahe. Bezüglich Definition und Eigenschaften der Thrombokinase sei auf S. 32 verwiesen.

Bisher sind Untersuchungen an synthetischen Substraten mit Thrombokinase kaum vorgenommen worden. Erst nach Abschluß unserer Untersuchungen wurde eine Arbeit von Milstone (114) bekannt, in der eine Wirkung von Thrombokinase auf TAMe beschrieben wurde.

Untersuchung der Wirkung von Hirnthrombokinase auf die Substrate:

L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$m),
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m),
L-Lysin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m).

Versuchsansatz: 8 ml Puffer + 4 ml Hirnthrombokinase. Daraus je 0,75 ml in Zentrifugenröhrchen + 0,25 ml Substrat. Es wurde ein Leerwert mitgeführt (0,75 ml Puffer — Thrombokinasegemisch + 0,25 ml physiologische Kochsalzlösung), um die Thrombokinase allein zu testen.

Ausführung des Versuches: wie oben S. 32—34 für Thrombin beschrieben.

Hirnthrombokinase: Herstellung des Präparates s. o. S. 32.

pH-Wert: 8,7.

Inkubationszeit: 24 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Spaltbreite: 0,035

Substrat	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
Leerwert	2	2
L-Arginin-β-Naphthylamid	2	181
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	13	5
L-Lysin-β-Naphthylamid	2	785

Diese Befunde sind sehr auffallend. Die Tatsache, daß die Hirnthrombokinase Arginin- und Lysinverbindungen spaltet, stützt die Annahme, daß sie ein Ferment

sein könnte. Nachdem kürzlich Milstone (114) eine entsprechende Wirkung auf TAMe feststellte, wird diese Ansicht dadurch ebenfalls bekräftigt.

Untersuchung der Wirkung von Plasmathrombokinase auf die Substrate:

L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$m),
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m),
L-Lysin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m).

Versuchsansatz und -ausführung: wie oben S. 59 bei dem Versuch mit Hirnthrombokinase beschrieben.

Plasmathrombokinase: Herstellung des Präparates s. o. S. 32.

pH-Wert: 8,7.

Inkubationszeit: 24 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Spaltbreite: 0,035.

Substrat	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
Leerwert	1	5
L-Arginin-β-Naphthylamid	2	167
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	112	8
L-Lysin-β-Naphthylamid	4	190

Auch mit Plasmathrombokinase wird der mit der Hirnthrombokinase erhobene Befund bestätigt.

Schlangengifte

Es sind zahlreiche Schlangengifte bekannt, die in die Blutgerinnung in fördernder oder hemmender Weise eingreifen (41, 115, 116, 117, 118).

In Zusammenhang mit unseren Untersuchungen sind nur die gerinnungsfördernden von Interesse. Sie haben entweder eine thrombinähnliche oder eine thrombokinaseähnliche Wirkung.

Thrombinähnlich wirkende Schlangengifte

Eine große Anzahl von Schlangengiften hat die Fähigkeit, auf Fibrinogen direkt einzuwirken und dieses zum Gerinnen zu bringen; solche Gifte sind Bothrops atrox, Bothrops jararaca, Bothrops nummifera, Crotalus adamanteus,

Crotalus horridus, Crotalus terrificus terrificus (117); die meisten dieser Gifte üben gleichzeitig eine thrombokinaseähnliche Wirkung aus (41). Die Reaktion zwischen Schlangengift und Fibrinogen verläuft bei einem pH-Wert von 6,8 (119, 120). Der Vorgang wird durch Calcium wesentlich beschleunigt (41, 117, 118). Die auf Fibrinogen einwirkenden Gifte wandeln dieses in ein fibrinähnliches Material um (117). Der Unterschied zu dem mit Thrombin gebildeten Fibrin besteht im Polymerisationsgrad, in der Art der Querverbindungen und in der Löslichkeit (41, 121). Das mit Thrombin gebildete Gerinnsel löst sich in Harnstoff (60%ig) nur, wenn es in Abwesenheit von Calcium und Serum entstanden ist, das mit Schlangengift gebildete Gerinnsel löst sich in jedem Fall leicht in Harnstoff (60%ig) und sogar spontan, wenn einer der beiden oben erwähnten Faktoren abwesend ist (121). Die Wirkung von Reptilase, einem Extrakt aus dem Gift von Bothrops jararaca, wurde von Blombäck (122) eingehend untersucht. Er fand den Unterschied in der Thrombin- und der Reptilasewirkung darin, daß das Verhältnis zwischen Tyrosin und Glycin in dem mit Thrombin gebildeten Fibrin 1 : 2 beträgt, während es in dem mit Reptilase gebildeten Fibrin 1 : 1 ist.

Diese Schlangengifte sind imstande, Benzoylargininamid (118, 123), BAMe (124), Benzoylargininäthylester (125), sowie TAMe (122, 126) zu spalten.

Thrombokinaseähnlich wirkende Schlangengifte

Gifte wie das von Notechus scutatus, von Micrurus und vor allem von Vipera Russellii (RVV) wirken in erster Linie thrombokinaseähnlich (117), andere wie das von Bothrops atrox, Bothrops jararaca und Crotalus basiliscus haben zwar auch die Fähigkeit, Prothrombin in Thrombin umzuwandeln, aber bei ihnen überwiegt die fibrinogengerinnende Aktivität (117).

Das Gift von Vipera Russellii (RVV) ist von den thrombokinaseähnlichen am besten untersucht. Es zeigte sich, daß die Wirkung von RVV von Faktor VII unabhängig ist (41, 127, 128, 129); zu seiner Wirkung sind aber Calcium, Faktor V und ein Lipoid notwendig (41, 128, 129). Durch die Reaktion dieser Faktoren miteinander entsteht ein artifizieller Prothrombinumwandlungsfaktor (s. S. 7).

RVV ist imstande, synthetische Substrate zu spalten; seine Wirkung wurde von Wagner und Farell (126) näher untersucht. Die Hydrolyse von TAMe erfolgt nach einer Kinetik nullter Ordnung. Das pH-Optimum für die Reaktion liegt in Tris-Puffer bei pH 8,7—9,0 und die Michaelis-Konstante ist

$$K_M = 1{,}05 \cdot 10^{-2}\ M.$$

Ein Vergleich zwischen RVV und kristallinem Trypsin zeigt, daß RVV sehr viel mehr Gerinnungsaktivität pro µg hat als das hochgereinigte Trypsin, obwohl RVV viel weniger Esteraseaktivität besitzt (126). Wagner und Farell führen

das entweder auf die relativen Spezifitäten der beiden Präparate zurück oder auf die Anwesenheit anderer aktiver Enzyme im RVV.

Untersuchung der Wirkung von Russell-Vipern-Gift auf die Substrate:

L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$m),
Tosyl-L-Argenin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m),
L-Lysin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$ m),
L-Leucin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m).

Versuchsansatz: 8 ml Puffer + 4 ml RVV. Daraus je 0,75 ml in Zentrifugenröhrchen + 0,25 ml Substrat. Ein Leerwert wurde mitgeführt (0,75 ml Puffer-RVV-Mischung + 0,25 ml physiologische Kochsalzlösung), um das RVV als solches zu prüfen.

Ausführung des Versuches: wie oben S. 32—34 für Thrombin beschrieben.

RVV: Herstellung des Präparates s. o. S. 32.

Ausgangskonzentration: ~ 3 mg/ml.

pH-Wert: 8,7.

Inkubationszeit: 24 Stunden.

Wir verwendeten 11 Ampullen mit je 0,5 mg reinem Toxin. Das Toxin liegt in einer Milchzuckerverreibung vor. Der Ansatz gelang nicht exakt, so daß nur mit einer ungefähren Menge von 3 mg reinem Toxin pro ml gerechnet werden kann.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Spaltbreite: 0,035

Substrat	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
Leerwert	8	2
L-Arginin-β-Naphthylamid	7	42
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid (verunreinigt)	111	25
L-Lysin-β-Naphthylamid	8	42
L-Leucin-β-Naphthylamid	9	51

Das Versuchsergebnis zeigt, daß alle geprüften Substrate angegriffen werden, allerdings nur sehr langsam. Am besten wird das L-Leucin-β-Naphthylamid gespalten, dann folgen L-Arginin- und L-Lysin-β-Naphthylamid und an letzter

Stelle steht Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid. RVV spaltet also nicht nur Ester (122, 126), sondern auch die peptidähnlichen β-Naphthylamide.

In jüngster Zeit gelang Michl und Kiss (130) durch Stärkeelektrophorese eine Lokalisierung der Giftproteasen. Bei Vipera lebetina, Crotalus adamanteus sind es zwei, bzw. mehrere Zonen. Es scheinen zwei Peptidasen vorhanden zu sein: ein der Leucinaminopeptidase ähnliches Enzym, das sehr gut L-Leucin-β-Naphthylamid spaltet (s. o.) und ein dem Thrombin ähnliches Enzym.

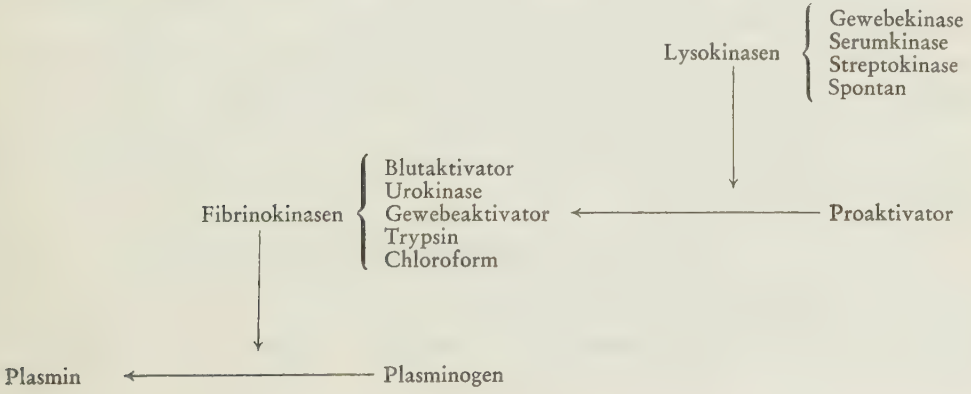
Plasmin

Plasmin ist jenes Ferment, dessen physiologische Aufgabe es ist, Fibringerinnsel zur Auflösung zu bringen. Es ist im Plasma nicht in freier Form enthalten, sondern in einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen. Der Mechanismus seiner Aktivierung weist viele Ähnlichkeiten mit demjenigen des Prothrombin auf. Auch hier gibt es ein bluteigenes, endogenes und ein blutfremdes, exogenes Aktivierungssystem (41, 46, 131, 132).

Der Blutaktivator liegt in einer inaktiven Vorstufe, als Proaktivator, im Blut vor (46, 131, 132, 133, 134, 135, 136). Der Proaktivator wird durch die sogenannten Fibrinolysokinasen zum Aktivator umgewandelt. Solche Fibrinolysokinasen finden sich in Geweben (46) und in Bakterien. Die bekannteste der Bakterien-Fibrinolysokinasen ist die Streptokinase aus den Streptokokken (46, 131, 132, 133, 134).

Die direkt am Plasmin angreifenden Aktivatoren bezeichnet man als Fibrinokinasen. Solche finden sich in fast allen Gewebezellen (Gewebeaktivator) (46, 131, 132) ferner im Harn (Urokinase) (46, 131, 132). Auch der Blutaktivator muß in diesem Sinn als Fibrinokinase aufgefaßt werden. Ferner ist eine Aktivierung des fibrinolytischen Fermentes durch Trypsin oder Chloroform möglich (46, 131, 132). (s. Schema).

Umwandlung von Plasminogen in Plasmin



Plasmin ist ein proteolytisches Ferment (131, 132, 137), dessen physiologisches Substrat das Fibrin ist (46), welches durch das Plasmin in große Molekülbruchstücke aufgespalten wird (131, 132). Plasmin ist aber auch imstande, Fibrinogen anzugreifen (46, 138), ein Vorgang, der als Fibrinogenolyse bezeichnet wird. Neben diesen Substraten vermag es auch den Gerinnungsfaktor V (131, 132, 139) anzugreifen, sowie das Komplement (140), Gelatine, Glucagon, Wachstumshormon und β-Lactoglobulin (132) und außerdem Plasmin durch Autodigestion (141).

Dank seiner proteolytischen Eigenschaften vermag es auch Casein zu spalten (131, 142), eine Eigenschaft, die sehr häufig zum Nachweis des Plasmins (142) mit mehr oder minder großer Berechtigung herangezogen wird.

Plasmin spaltet aber auch rein synthetische Substrate, wobei sein Aktivitätsmaximum gegen Lysin- und Arigininverbindungen gerichtet ist (92, 143). Die maximale Spaltung von TAMe findet in Tris-Puffer bei pH 9,0 statt. Dabei liegt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratkonzentrationen im Bereich von 0,015 m bis 0,05 m TAMe. Bei einer Substratkonzentration von 0,02 m TAMe ist die Michaeliskonstante

$$K_M = 4 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

Die maximale Spaltung von LEe liegt in Imidazol-Puffer bei pH 6,5. Dabei zeigt sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratkonzentrationen von 0,03 m und etwas darüber. Bei einer Substratkonzentration 0,04 m LEe ist die Michaeliskonstante

$$K_M = 1{,}7 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

Die Reaktion zwischen Plasmin und diesen Substraten gehorcht einer Kinetik nullter Ordnung bis 60% des Substrates gespalten sind (143).

Setzt man diese Substrate einer Aktivierungsmischung von Plasminogen zu, so wird die Reaktion deutlich gehemmt. Die Ester stellen also kompetitive Inhibitoren der Plasminogenaktivierung dar (143).

Die Esteraseaktivität des Plasmins wird definiert als die Anzahl Mikromole des Esters, die in 30 Minuten bei 37° C gespalten werden (143).

Wegen der oben geschilderten Eigenschaften und Wirkungen des Plasmins war es von Interesse zu prüfen, welche unserer synthetischen Substrate von Plasmin angegriffen werden.

Untersuchung der Wirkung von Plasmin auf folgende Substrate:

L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$m),
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m),
L-Lysin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m).

Versuchsansatz: 8 ml Puffer + 4 ml Plasmin. Daraus je 0,75 ml in Zentrifugenröhrchen + 0,25 ml Substrat. Es wurde ein Leerwert mitgeführt (0,75 ml Puffer-Plasmin-Gemisch + 25 ml physiologische Kochsalzlösung), um das Plasmin als solches zu prüfen.

Ausführung des Versuches: wie oben S. 32—34 für Thrombin beschrieben.

Plasmin: Präparat siehe oben S. 32.

Ausgangskonzentration: 1,365 Casein-Einheiten pro ml.

pH-Wert: 8,7.

Inkubationszeit: 24 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Substrat	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
Leerwert	0	5
L-Arginin-β-Naphthylamid	2	51
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	14	9
L-Lysin-β-Naphthylamid	2	54

Aus der Tabelle geht hervor, daß Plasmin Lysin- und Argininverbindungen anzugreifen vermag. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der oben erwähnten Arbeit von Sherry, Troll und Wachmann (143).

Plasmin vermag offensichtlich nicht die substituierte Argininverbindung Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid zu hydrolysieren. Diese Tatsache ist für eine Bestimmung von Thrombin und Plasmin innerhalb eines einzigen Systems, z. B. des Serums, von grundlegender Bedeutung. Diese Möglichkeit der Bestimmung beider Fermente nebeneinander scheint erstmals mit diesem Substrat gegeben.

Die Fibrinokinasen wirken direkt auf das Plasminogen ein und verwandeln dieses in das aktive fibrinolytische Ferment. Zu ihnen gehören die stabilen Gewebeaktivatoren, der labile Blutaktivator, die Urokinase und das Trypsin (46, 131, 132).

Die Fibrinokinasen sind proteolytische Fermente, welche im Plasminogen eine Lysin- oder Argininverbindung spalten (131, 132, 144). Ihre Wirkung auf BAMe und LEe wurde eingehend untersucht (144). Es ergibt sich eine lineare Relation zwischen dem reziproken Wert der Konzentration des Plasminogens und dem reziproken Wert der Reaktionsgeschwindigkeit, so daß das Lineweaver-Burksche Gesetz (145) erfüllt und die Annahme einer enzymatischen Reaktion gerechtfertigt erscheint.

Die oben erwähnten synthetischen Substrate wirken auch als kompetitive Inhibitoren der Aktivierung von Plasminogen (144).

Da uns Reinpräparate dieser Aktivatoren nicht zur Verfügung standen, konnten wir entsprechende Untersuchungen nicht durchführen.

Unter *Fibrinolysokinasen* versteht man Aktivatoren des fibrinolytischen Systems, welche nicht am Plasminogen selbst angreifen, sondern im Umweg über den im Blut vorhandenen Proaktivator zur Wirkung kommen (46, 131, 132). Fibrinolysokinasen finden sich in verschiedenen Geweben (46), sowie in Bakterien. Die bekannteste dieser Substanzen ist die aus Streptokokken gewonnene Streptokinase (41, 46, 131, 132, 133, 134). Sie ist nicht imstande, synthetische Substrate oder Casein selbst anzugreifen (131, 132) und dürfte daher auch kein proteolytisches Ferment sein. Wenn sie jedoch mit einem im Blut vorhandenen Cofaktor, dem Proaktivator, reagiert hat, aktiviert sie Plasminogen (46, 131, 132). Sie greift dann BAMe und LEe in gleicher Weise an wie vorhin für die Fibrinokinasen beschrieben (144). Es ist derzeit noch umstritten, ob Proaktivator und Plasminogen zwei verschiedene Moleküle oder miteinander identisch sind (132). In letzterem Falle muß jedoch angenommen werden, daß das Plasminogenmolekül zwei verschiedene aktive Zentren zu entwickeln imstande ist, mit denen es einmal als Aktivator Plasminogen aktiviert, das andere Mal als Plasmin seine fibrinolytische Wirkung entfaltet. Die Reaktion zwischen Streptokinase und Proaktivator (Plasminogen) dürfte jedenfalls eine stöchiometrische sein, während das Reaktionsprodukt auf Plasminogen nach Art eines proteolytischen Fermentes wirkt (41, 131, 132, 144).

Untersuchung der Wirkung von Streptokinase auf die Substrate:

L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$m),

Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m),

L-Lysin-β-Naphthylamid ($c = 10^{-2}$m).

Versuchsansatz: 8 ml Puffer + 4 ml Streptokinase. Daraus je 0,75 ml in Zentrifugenröhrchen + 0,25 ml Substrat. Es wurde ein Leerwert mitgeführt (0,75 ml Streptokinase-Puffergemisch + 0,25 ml physiologische Kochsalzlösung), um die Reaktion der Streptokinase allein zu prüfen.

Ausführung des Versuches: wie oben S. 32—34 für Thrombin beschrieben.

Streptokinase: Präparat s. oben S. 32.

Ausgangskonzentration: 10 000 E/ml.

pH-Wert: 8,7.

Inkubationszeit: 24 Stunden.

Durchschnittliche Extinktionswerte

Substrat	Blindwert	Versuchswert minus Blindwert
Leerwert	3	3
L-Arginin-β-Naphthylamid	4	6
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	14	8
L-Lysin-β-Naphthylamid	5	7

Man sieht aus der Tabelle, daß Streptokinase keines der Substrate anzugreifen vermag. Dies steht in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Astrup (46), Sherry und Alkjaersig (131) und Sherry, Fletcher und Alkjaersig (132) und spricht dafür, daß die Streptokinase kein proteolytisches Ferment ist.

III. Diskussion

Thrombin ist ein proteolytisches Enzym, das unter physiologischen Bedingungen in erster Linie Arginylpeptidbindungen im Fibrinogenmolekül spaltet. Es kann aber auch derartige Bindungen in anderen Substraten, so in Faktor V und VIII, angreifen. Die quantitative chemische Erfassung der unter biologischen Bedingungen entstehenden Bruchstücke, die zur Verfolgung der Reaktion erforderlich wäre, ist außerordentlich schwierig, so daß man sich meist mit der Anwendung der viel weniger exakten, aber viel leichter durchführbaren, gerinnungsanalytischen Methoden begnügen muß.

Thrombin teilt mit einer Reihe anderer proteolytischer Enzyme die Fähigkeit, verschiedene synthetische Aminosäureester zu spalten, so daß diese auch zum Studium der Wirkungsweise von Thrombin herangezogen werden können. Es erscheint allerdings zweifelhaft, ob die esterolytische Wirkung von Thrombin mit der gerinnungsauslösenden gleichgesetzt werden darf. Die unbedingte Vergleichbarkeit beider Wirkungen erscheint um so mehr in Frage gestellt, als Seegers in letzter Zeit Thrombinpräparate hergestellt hat, die Esterasewirkung, aber keine gerinnungsauslösende Wirkung besitzen. Aus diesen Gründen erschien es uns wünschenswert, synthetische Substrate herzustellen, die in ihrer Struktur den Peptiden näher kommen als die synthetischen Ester. Wir glauben, solche in den L-Aminosäure-β-Naphthylamiden gefunden zu haben. Diese besitzen neben der größeren strukturellen Ähnlichkeit noch den Vorteil, daß das abgespaltene β-Naphthylamid durch Diazotierung und Kopplung mit einer entsprechenden Verbindung nachgewiesen werden kann, während die Titration der freigesetzten Aminosäure, oder, bei Anwendung von Säureamiden, die Erfassung des freiwerdenden Ammoniaks, viel größere Schwierigkeiten bereitet.

Wir haben die β-Naphthylamide des Tosyl-L-Arginins, L-Arginins-, L-Lysins und L-Ornithins hergestellt und ihr Verhalten gegenüber Thrombin geprüft. Außerdem haben wir das von Riedel, Wünsch, und Hartl (103) dargestellte N-(α)-Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid, das L-Tyrosin-β-Naphthylamid und das L-Leucin-β-Naphthylamid in unsere Untersuchungen einbezogen. Es zeigte sich, daß sich diese Substrate nicht in gleicher Weise für Thrombin eignen. Unterschiede ergaben sich in ihrer verschiedenen Empfindlichkeit gegenüber Thrombin und in ihren physikalischen Eigenschaften.

Einen Vergleich zwischen den Spaltbarkeiten der einzelnen Substrate bietet die Tabelle 1.

Nimmt man die Aktivität von Thrombin gegenüber Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid als 1 an, so ist die Aktivität gegenüber frischem L-Arginin-β-Naphthylamid etwa dieselbe; gegenüber Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid ist sie 0,46 und gegenüber L-Lysin-β-Naphthylamid 0,03; L-Tyrosin-β-Naphthylamid und L-Ornithin-β-Naphthylamid werden nicht angegriffen.

Kürzlich haben Martin und Mitarbeiter (69) über die Spaltung von Carbobenzoxy-L-tyrosin-p-nitrophenylester durch Thrombin berichtet. In unseren Versuchen jedoch wurde L-Tyrosin-β-Naphthylamid nicht angegriffen. Ob der Unterschied auf Verwendung eines substituierten Tyrosins durch Martin oder auf Verwendung eines verunreinigten Thrombin zurückzuführen ist, kann vorläufig nicht geklärt werden.

Durch die Untersuchung der L-Aminosäure-β-Naphthylamide hofften wir, die Spezifität von Thrombin näher charakterisieren zu können. Ersatz der ω-Guanidinogruppe des Arginins durch eine NH_2-Gruppe, wie dies beim Ornithin bzw. Lysin der Fall ist, oder Blockierung der α-NH_2-Gruppe durch einen Acyl-

Tab. 1: *Wirkung von Thrombin auf synthetische Aminosäure-β-Naphthylamide*
(Versuchsbedingungen: Tris-Puffer, Temperatur: 37° C; Inkubationszeit: 24 Stunden; Thrombinausgangskonzentration: 300 N.I.H.-E/ml)

Substrat	Substratmenge im Reaktionsgemisch [μ Mol]	Menge β-Naphthylamin im Reaktionsgemisch [μ g]	Nach 24 Std. freigesetztes β-Naphthylamin [μ g]	Nach 24 Std. gespaltenes Substrat [μ Mol]	Nach 24 Std. gespaltenes Substrat %	Gespaltenes Substrat pro Std. pro Einheit Thrombin [μ Mol]	pH-Wert
Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid	2,5	357	150,0	1,05	42	14.10^{-3}	7,7
L-Arginin-β-Naphthylamid (frisches Substrat)	2,5	357	>95,5	>0,67	>26,7	$>9.10^{-3}$	7,4
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	2,5	357	67,9	0,48	19	$6{,}3.10^{-3}$	8,0
L-Lysin-β-Naphthylamid	2,5	357	6,2	0,043	1,7	$0{,}57.10^{-3}$	7,7
L-Tyrosin-β-Naphthylamid (Inkubationszeit: 26 Stunden)	2,5	357	2,1	0,015	0,6	$0{,}2.10^{-3}$	7,4
L-Ornithin-β-Naphthylamid	2,5	357	—	—	—	—	—

rest (Tosyl-, Benzoylrest) sollte zeigen, welche Atomgruppierungen für Thrombin zur Ausbildung des hypothetischen Enzym-Substrat-Komplexes am geeignetsten sind. Aus unseren Versuchen wird deutlich, daß Thrombin, ebenso wie bei den synthetischen Estern, jene Aminosäure-β-Naphthylamide am besten angreift, die Argininderivate sind. Von diesen wird das unsubstituierte L-Arginin-β-Naphthylamid am besten gespalten, dann folgt mit geringem Unterschied das Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid und mit größerem Abstand das Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid.

Für die praktische Anwendung der Methode möchten wir aber das Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid der unsubstituierten Verbindung vorziehen, da es sich gezeigt hat, daß sich das Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid wegen seiner größeren Wasserlöslichkeit und seiner höheren Stabilität für die Untersuchungen besser eignet als die nicht substituierte Verbindung. Letztere muß jedesmal vor Gebrauch durch Erhitzen in Lösung gebracht werden, wobei sie sich offenbar verändert, denn die Versuche ergaben, daß die Spaltbarkeit mit dem Alter beträchtlich abnimmt (Vergl. Teil II).

Ein Vergleich mit den Untersuchungen von Sherry und Troll (12) ergibt, daß Thrombin Aminosäureester wesentlich schneller spaltet als die entsprechenden Aminosäure-β-Naphthylamide (Tab. 2).

Tab. 2: *Wirkung von Thrombin auf synthetische Aminosäureester*
(Versuchsbedingungen: Thrombin Upjohn; Temperatur: 37° C; Reaktionszeit: 30 Min.)
Nach Sherry und Troll (12)

Substrat	Hydrolyse %	Thrombineinheiten im Versuch	Gespaltenes Substrat pro Std. pro Einheit Thrombin [µ Mol]	pH	Puffer
Tosylargininmethylester (0,04 m)	40	5	6,4	9,0	Tris
Benzoylargininäthylester (0,04 m)	20	5	3,2	9,0	Tris
Argininäthylester (0,04 m)	57	250	0,182	9,0	Tris
Benzoylargininamid (0,04 m)	10	250	8.10^{-3} bei 2 Std. Reaktionszeit 56.10^{-4} bei 17 Std. Reaktionszeit	9,0	Tris
Lysinäthylester (0,02 m)	—	—	—	6,5	Imidazol

Ehrenpreis und Mitarbeiter (67) fanden später, daß auch Lysinverbindungen von Thrombin angegriffen werden. Versuche, die bei pH 6,5, 0,15 m KCl und bei 25° C ausgeführt wurden, ergaben, daß 0,02 m Lysinäthylester zu 10% in 30 Minuten von 100 TAMe-Einheiten Thrombin-Parke Davis- bzw. 125 TAMe-Einheiten von Sherry und Troll (12), gespalten werden. Umgerechnet auf μMol pro Stunde und pro Einheit Thrombin beträgt die Hydrolyse 0,032 μMol.

Vergleicht man nun die von Sherry und Troll einerseits und von Ehrenpreis und Mitarbeitern andererseits gefundenen Werte mit unseren, so sieht man, daß die Ester in hohem Maße angegriffen werden, dann folgen die Amide und schließlich die L-Aminosäure-β-Naphthylamide. Aus kurzfristigen Versuchen errechnet sich die Spaltung von L-Arginin-β-Naphthylamid mit $12 \cdot 10^{-4}$ μ Mol pro Einheit Thrombin pro Stunde, was 4 bis 8 mal geringer ist als der von Sherry und Troll für Benzoyl-Argininamid angegebene Wert.

Ferner wurde geprüft, welchen Einfluß die L-Aminosäure-β-Naphthylamide auf die Blutgerinnung ausüben. Es zeigte sich, daß die Substrate Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid, L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Lysin-β-Naphthylamid die Wirkung von Thrombin auf Fibrinogen nicht beeinflussen, wenn sie nicht vorher mit Thrombin inkubiert wurden. Dies kann man wohl dahingehend deuten, daß die Affinität von Thrombin zu den synthetischen Substraten geringer ist als zu Fibrinogen (Abb. 17—19).

Hingegen werden Thrombokinasebildungstest und Thrombinbildung im Zweistufentest nach Seegers in gleicher Weise deutlich gehemmt (Abb. 20—22), was dafür spricht, daß die synthetischen Substrate mit der Bildung oder der Wirkung der Thrombokinase interferieren. Eine genauere Lokalisation des Angriffspunktes im mehrstufigen Ablauf der Reaktionen, die zur Bildung des aktiven Prothrombinumwandlungsfaktors führen, ist derzeit noch nicht möglich.

Was die praktische Bedeutung der von uns entwickelten Methode betrifft, so ist diese darin gelegen, daß die Spaltprodukte der L-Aminosäure-β-Naphthylamide gerade in unreinen Systemen wesentlich leichter nachweisbar sind als die Spaltprodukte der synthetischen Ester oder der nicht substituierten Säureamide. Da die Säureamidbindung der Peptidbindung der natürlichen Substrate von Thrombin und der übrigen, in die Gerinnung eingreifenden Fermente, wesentlich näher kommt, sind Rückschlüsse von diesen Substraten auf die natürlichen Verhältnisse eher gerechtfertigt als Rückschlüsse, die von der Spaltung synthetischer Aminosäureester gezogen werden. Darüber hinaus wird diese Methode vielleicht eine Möglichkeit bieten, zwischen Esterasethrombin und Gerinnungsthrombin auch mit Hilfe synthetischer, wohl definierter Systeme zu unterscheiden.

Unsere Untersuchungen brachten ferner Aufschluß über die Reaktionsabläufe zwischen Thrombin und den L-Aminosäure-β-Naphthylamiden; es zeigte sich, daß diese den allgemeinen Gesetzen der Enzym-Substrat-Reaktionen folgen.

So ist die Spaltung weitgehend vom pH des Reaktionsgemisches abhängig (Tab. 3, Abb. 2—5).

Ferner weist die Spaltung der Substrate eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf (Abb. 6—10). Bei Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit im Laufe von 24 Stunden etwas ab, bei L-Lysin-β-Naphthylamid ist dagegen in der gleichen Zeit eine ständige Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten. Bei L-Arginin-β-Naphthylamid hört die Spaltung nach 20 Stunden nahezu auf; neuerliche Substratzugabe nach 24 Stunden

Tab. 3: *Optimale pH-Werte für die Wirkung von Thrombin auf verschiedene Aminosäure-β-Naphthylamide.*
(Versuchsbedingungen: Tris-Puffer; Temperatur: 37° C; Inkubationszeit: 24 Stunden)

Substrat	Optimaler pH-Wert
L-Arginin-β-Naphthylamid	7,4
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	8,0
L-Lysin-β-Naphthylamid	8,0
L-Ornithin-β-Naphthylamid	—

L-Ornithin-β-Naphthylamid wird von Thrombin nicht angegriffen.

ermöglicht ein Wiedereinsetzen der Thrombinwirkung (s. Abb. 9), was wohl durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Ferment, Substrat und Spaltprodukten erklärt werden kann.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist weiterhin bei konstanter Enzymkonzentration von der Substratkonzentration abhängig (Abb. 11—13). Wir haben als Ausgangssubstanzen 10^{-2} molare Lösungen unserer Substrate verwendet; eine höhere Konzentration konnte wegen der geringen Löslichkeit der Substrate nicht erreicht werden. Die prozentuelle Spaltung nimmt bei gleichbleibender Enzymkonzentration für alle getesteten Substrate mit abnehmender Substratkonzentration zu (vgl. S. 46—48). Vergleicht man jedoch die mit konstanten Fermentkonzentrationen jeweils freigesetzten absoluten Mengen an β-Naphthylamin, so werden Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Lysin-β-Naphthylamid unverdünnt am besten gespalten, L-Arginin-β-Naphthylamid hingegen bei einer Ausgangskonzentration von $c = 0{,}5 \cdot 10^{-2}$m.

Ferner ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Substratkonzentration von der Thrombinkonzentration abhängig und ihr proportional (Abb. 14—16). Bei L-Arginin-β-Naphthylamid zeigt sich während einer Inkubationszeit von 6 Stunden bis zu einer Ausgangskonzentration von 300 N.I.H.-Einheiten Thrombin pro ml eine rasche Zunahme der Spaltung, während mit höheren Konzentrationen nur noch eine geringfügig gesteigerte Spaltung erzielt werden konnte. Bei Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid nimmt die Spaltung während 24 Stunden mit niederen Thrombinkonzentrationen rasch, mit hohen verlangsamt zu.

Um den Ablauf der Reaktion zwischen Thrombin und den L-Aminosäure-β-Naphthylamiden noch näher charakterisieren zu können, prüften wir die Beeinflussung durch Diisopropylfluorphosphat (DFP) (Abb. 23). Miller und Van Vunakis (48), Gladner und Laki (66) fanden, daß sowohl die Esterase- als auch die Proteasewirkung von Thrombin durch DFP gehemmt wird. In gleicher Weise wird die Spaltung der Aminosäure-β-Naphthylamide durch DFP gehemmt (Tab. 4).

Tab. 4 : *Hemmung der Wirkung von Thrombin auf synthetische Aminosäure-β-Naphthylamide durch DFP.*

(Versuchsbedingungen: Tris-Puffer; Temperatur: 37° C; Inkubationszeit: 24 Stunden)

Substrat	Ausgangskonzentration von Thrombin [N.I.H.-Einheiten pro ml]	Konzentration des DFP im Reaktionsgemisch	Hemmung %	pH
L-Arginin-β-Naphthylamid	300	10^{-4} m	67,7	7,4
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	300	10^{-4} m	79,9	8,0
L-Lysin-β-Naphthylamid	1000	10^{-4} m	32,2	7,7

Die Hemmung setzt offenbar sofort ein. Wie in einem Versuch mit Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid als Substrat gezeigt werden konnte, hemmt 10^{-3} molares DFP die Fermentaktivität zu 95%. Das Ausmaß der Hemmung nimmt innerhalb von 24 Stunden weder zu noch ab.

Zum Vergleich sind die von Miller und Van Vunikis (48) für die Hemmung der Esterase- und Proteaseaktivität von Citrat- und Biothrombin angegebenen Werte in Tab. 5 dargestellt.

Es erweist sich also, daß die Thrombinwirkung auf die Aminosäure-β-Naphthylamide durch DFP in gleicher Konzentration gehemmt wird wie die Wirkung auf Fibrinogen und auf synthetische Ester.

Tab. 5: *Hemmung der Esterase- und Proteaseaktivität von Citrat- und Biothrombin durch DFP.* (Versuchsbedingungen: Thrombinlösungsmittel: 0,15 m NaCl; Imidazolpuffer, pH 7,2, Temperatur: 25° C; Inkubationszeit: 15 Min.); — Nach Miller und Van Vunakis (48)

		Ausgangskonzentration von Thrombin	Konzentration von DFP im Reaktionsgemisch	Hemmung %	Inkubationszeit [Min.]	pH
Citrat-Thrombin (0,33 mg N pro ml)	Esterase-Aktivität	395 E/ml von Sherry und Troll	2.10^{-4} m	50	15	7,2
	Protease-Aktivität	2640 N.I.H.-Einheiten pro ml	2.10^{-4} m	50	15	7,2
Bio-Thrombin	Esterase-Aktivität	395 E/ml von Sherry und Troll	1.10^{-4} m	50	15	7,2
	Protease-Aktivität	2640 N.I.H.-Einheiten pro ml	1.10^{-4} m	50	15	7,2

Thrombin ist nun aber nicht das einzige im Gerinnungssystem wirkende Enzym, das die oben beschriebenen Substrate angreift. So sind Plasma- und Hirnthrombokinase imstande, L-Lysin-β-Naphthylamid und L-Arginin-β-Naphthylamid zu spalten, während Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid nicht angegriffen wird. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: *Wirkung von Plasma- und Hirnthrombokinase auf synthetische Aminosäure-β-Naphthylamide.*
(Versuchsbedingungen: Tris-Puffer, pH 8,7, Temperatur: 37° C; Inkubationszeit: 24 Stunden)

Substrat	Freigesetztes β-Naphthylamin nach 24 Std. [µg]		Gespaltenes Substrat nach 24 Std. [µMol]	
	Plasmathrombokinase	Hirnthrombokinase	Plasmathrombokinase	Hirnthrombokinase
L-Arginin-β-Naphthylamid (älteres Substrat)	13,9	15,1	0,097	0,106
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid	0,67	0,42	0,0047	0,0029
L-Lysin-β-Naphthylamid	15,9	65,5	0,111	0,458

Die Ergebnisse stützen die Vermutung, daß die Thrombokinase ein Enzym sein könnte. Im gleichen Sinne sprechen auch die Untersuchungen von Milstone (144), der zeigte, daß TAMe durch Thrombokinase gespalten wird.

Für das Schlangengift von Vipera Russellii (RVV) konnten wir eine zwar langsame, aber deutliche Wirkung auf unsere Substrate verzeichnen. Für diese Versuche zogen wir noch das Substrat L-Leucin-β-Naphthylamid hinzu und erhielten die in Tab. 7 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 7: *Wirkung von RVV auf synthetische Aminosäure-β-Naphthylamide.*
(Versuchsbedingungen: Tris-Puffer, pH 8,7, Temperatur: 37° C; Inkubationszeit: 24 Stunden; Ausgangskonzentration von RVV: 3 mg/ml)

Substrat	Freigesetztes β-Naphthylamin [µg]	Gespaltenes Substrat pro 24 Std. pro 3 mg RVV [µMol]
L-Leucin-β-Naphthylamid	4,25	0,0298
L-Lysin-β-Naphthylamid	3,50	0,0246
L-Arginin-β-Naphthylamid (älteres Substrat)	3,50	0,0246

L-Leucin-β-Naphthylamid hat also die größte Empfindlichkeit, der aber L-Lysin-β-Naphthylamid und L-Arginin-β-Naphthylamid kaum nachstehen. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von Wagner und Farrell (126), welche die Wirkung von RVV auf TAMe untersuchten, ergibt, daß auch RVV synthetische Ester wesentlich schneller angreift als die Aminosäure-β-Naphthylamide.

Bei der Untersuchung von Plasmin fanden wir, daß dieses L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Lysin-β-Naphthylamid mit gleicher Aktivität zu spalten vermag (Tab. 8).

Tab. 8: *Wirkung von Plasmin auf synthetische Aminosäure-β-Naphthylamide.*
(Versuchsbedingungen: Tris-Puffer, pH 8,7, Temperatur: 37° C; Inkubationszeit: 24 Stunden; Plasminausgangskonzentration: 1,365 Casein-E/ml)

Substrat	Freigesetztes β-Naphthylamin nach 24 Std. [µg]	Gespaltenes Substrat nach 24 Std. [µMol]	Gespaltenes Substrat pro 24 Std. pro Casein-Einheit Plasmin [µMol]
L-Arginin-β-Naphthylamid (älteres Substrat)	4,25	0,0298	$2{,}18 \cdot 10^{-2}$
L-Lysin-β-Naphthylamid	4,42	0,031	$2{,}27 \cdot 10^{-2}$

Synthetische Aminosäureester werden jedoch viel schneller von Plasmin gespalten (Tab. 9).

Tab. 9: *Wirkung von Plasmin auf verschiedene synthetische Aminosäureester.* Nach Troll, Sherry und Wachmann (143)

Substrat	Esteraseaktivität eines Präparates von Plasma-Fraktion III [µMol pro Std. pro mg Enzym, bei 37° C]		
	Plasmin spontan aktiviert	Plasmin mit Streptokinase aktiviert	pH
L-Argininäthylester (0,02 m)	20	52	7
Benzoylargininmethylester (0,02 m)	20	286	9
P-Tosyl-L-Arginin-	40	320	9
Methylester (0,02 m)	40	320	9
Äthylester (0,02 m)	20	160	9
Butylester (0,01 m)			
L-Lysinäthylester (0,04 m)	20	184	6,5

Unsere Versuche mit der Fibrinolysokinase Streptokinase brachten das Ergebnis, daß diese keines unserer Aminosäure-β-Naphthylamidsubstrate angreift, was in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Astrup (46) und Sherry und Mitarbeitern (131, 132) dafür spricht, daß die Streptokinase selbst kein proteolytisches Enzym ist.

IV. Zusammenfassung

1. Es wurden Substrate für das Gerinnungsferment Thrombin hergestellt; als solche wurden die L-Aminosäure-β-Naphthylamide gewählt, die leichter nachweisbar sind als die bisher verwendeten Säureamide.

2. Folgende Aminosäure-β-Naphthylamide wurden synthetisiert und untersucht:

   a) L-Arginin-β-Naphthylamid

   b) Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid

   c) L-Lysin-β-Naphthylamid

   d) L-Ornithin-β-Naphthylamid.
   Ferner wurden geprüft:
   Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid
   L-Tyrosin-β-Naphthylamid
   L-Leucin-β-Naphthylamid (dieses allerdings nur auf seine Empfindlichkeit gegenüber RVV).

3. Thrombin spaltet L-Arginin-β-Naphthylamid am schnellsten. Dann folgen Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid, Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Lysin-β-Naphthylamid. L-Ornithin-β-Naphthylamid und L-Tyrosin-β-Naphthylamid werden von Thrombin nicht angegriffen.
   Für die praktische Anwendung ist Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid am besten geeignet. Die Gründe hierfür werden diskutiert.

4. Die Reaktion zwischen Thrombin und den synthetischen Substraten ist vom pH-Wert, der Inkubationszeit, der Enzym- und der Substratkonzentration abhängig.

5. Beeinflussung der Blutgerinnung durch die synthetischen Substrate.

   a) Die II. Phase der Gerinnung wird nicht nachweisbar beeinflußt.

   b) Die I. Phase der Gerinnung wird durch konzentrierte, d. h. 10^{-2} molare, Lösungen der Substrate vollkommen gehemmt, durch $0{,}33 \cdot 10^{-2}$, $1{,}67 \cdot 10^{-2}$ und $1{,}11 \cdot 10^{-2}$ molare Lösungen verzögert und bleibt durch noch mehr verdünnte, 10^{-3} molare, Lösungen unbeeinflußt.

c) Die Vorphase der Gerinnung wird durch konzentrierte, d. h. 10^{-2} molare, Lösungen von Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid und L-Arginin-β-Naphthylamid vollkommen gehemmt. 10^{-2}molare Lösungen von L-Lysin-β-Naphthylamid hemmen die Vorphase ebenfalls, sind aber wenig aktiv. Mit Verdünnung der Substrate wird die Wirkung geringer und hört bei einer Konzentration von $c = 10^{-3}$ m auf.

6. Die Reaktion zwischen Thrombin und den L-Aminosäure-β-Naphthylamiden kann durch DFP gehemmt werden.

7. RVV spaltet die Substrate
L-Leucin-β-Naphthylamid,
L-Lysin-β-Naphthylamid und
Tosyl-L-Arginin-β-Naphthylamid.

8. Blutthrombokinase und Hirnthrombokinase spalten die Substrate:
L-Lysin-β-Naphthylamid und
L-Arginin-β-Naphthylamid.

9. Plasmin spaltet die Substrate:
L-Lysin-β-Naphthylamid und
L-Arginin-β-Naphthylamid.

10. Streptokinase greift keines der Substrate an. Sie dürfte allein kein proteolytisches Enzym sein.

11. Die praktische Bedeutung der von uns entwickelten Methode wird dargelegt.

V. Literatur

(1) Schmidt, A.: Pflüger's Arch. f. Physiologie **6**, 413 (1872).
(2) Schmidt, A.: Die Lehre der fermentativen Gerinnungserscheinungen, Dorpat (1876).
(3) Hammersten, O.: Pflüger's Arch. f. Physiologie **22**, 431 (1880).
(4) Stuber, B., und K. Lang: Die Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung. Berlin-Wien. Verlag: Urban und Schwarzenberg (1930).
(5) Wöhlisch, E.: Ergebnisse der Physiologie **28**, 443 (1929).
(6) Wöhlisch, E.: Ergebnisse der Physiologie **43**, 174 (1940).
(7) Bailey, K., F. R. Bettelheim, L. Lorand and W. R. Middlebrook: Nature **167**, 233 (1951).
(8) Bettelheim, F. R., and K. Bailey: Biochem. Biophys. Acta **9**, 578 (1952).
(9) Bailey, K., and F. R. Bettelheim: Biochem. Biophys. Acta **18**, 495 (1955).
(10) Lorand, L.: Biochem. J. **52**, 200 (1952).
(11) Lorand, L., and W. R. Middlebrook: Science **118**, 515 (1953).
(12) Sherry, S., and W. Troll: J. Biol. Chem. **208**, 95 (1954).
(13) Hofmann, K., M. Bergmann: J. Biol. Chem. **130**, 81 (1939).
(14) Schwerth, G. W., and M. A. Eisenberg: J. Biol. Chem. **179**, 665 (1949).
(15) Margolis, J.: VII. Congr. Int. Soc. Haemat., Rom, Paper Nr. 354, P. 283 (1958).
(16) Hardisty, R. M., and J. Margolis: Brit. J. of Haemat. **5**, 203 (1959).
(17) Margolis, J.: Nature **180**, 1464 (1957).
(18) Margolis, J.: J. of Physiol. **144**, 1 (1958).
(19) Waaler, B. A.: Contact activation in the intrinsic blood clotting system. Oslo (1959).
(20) Bergsagel, D. E., and C. Hougie: Brit. J. of Haemat. **2**, 113 (1956).
(21) Bergsagel, D. E.: Brit. J. of Haemat. **2**, 130 (1956).
(22) Fisch, U.: Thromb. Diath. Haem. **2**, 60 (1958).
(23) Fisch, U., und F. Duckert: Thromb. Diath. Haem. **3**, 98 (1959).
(24) Mammen, E., and W. H. Seegers, in press.
(25) Seegers, W. H., and S. A. Johnson: Am. J. of Physiol. **184**, 259 (1956).
(26) Seegers, W. H., and N. Alkjaersig: Arch. Biochem. and Biophys. **61**, 1 (1956).
(27) Biggs, R., and E. Bidwell: Blood Clotting Factors, Symp. X, IV. Int. Congr. of Biochem., Vienna, P. 172 (1959).
(28) Waaler, B. A.: Blood Clotting Factors, Symp. X, IV. Int. Congr. of Biochem., Vienna, P. 189 (1959).
(29) Lüscher, E. F.: Schweiz. Med. Wschr. **89**, 1021 (1959).
(30) Lüscher, E. F.: Schweiz. Med. Wschr. **86**, 345 (1956).
(31) Sharp, A. A.: Brit. J. of Haemat. **4**, 28 (1958).
(32) Koller, E.: Int. Symp., Malmö-Schweden, P. 223 (1956).
(33) Seegers, W. H.: Advances in enzymology and related subjects of biochemistry **16**, 23 (1955).
(34) Seegers, W. H.: Circulating Research **4**, 126 (1956).
(35) Streuli, F,: Thromb. Diath. Haem. **3**, 194 (1959).
(36) Owren, P. A.: Revue d'Hématologie **10**, 350 (1955).
(37) Seegers, W. H., and N. Alkjaersig: Circulating Research **3**, 514 (1955).

(38) Koller, E.: Thromb. Diath. Haem. **2**: 407 (1958).
(39) Laki, K., J. A. Gladner, J. E. Folk and D. R. Kominz: Thromb. Diath. Haem. **2**, 205 (1958).
(40) Blombäck, B.: Acta Physiol. Scand. **43**, 145 (1958).
(41) Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren. Verlag: Franz Deuticke, Wien (1955).
(42) Lorand, L.: Phys. Rev. **34**, 742 (1954).
(43) Ware, A. C., B. C. Murphy and W. H. Seegers: Science **106**, 618 (1947).
(44) Ballerini, G.: VII. Annual Symp. on Blood (17—18. Jan. 1958), Referat in: Thromb. Diath. Haem. **2**, 179 (1958).
(45) Seegers, W. H., and R. H. Landaburu: Am. J. of Physiol. **191**, 167 (1957).
(46) Astrup, T.: Blood **11**, 781 (1956).
(47) Lorand, L., N. Alkjaersig and W. H. Seegers: Arch. Biochem. and Biophys. **45**, 312 (1953).
(48) Miller, K. D., and H. Van Vunakis: J. Biol. Chem. **223**: 227 (1956).
(49) Roka, L.: Blood Clotting Factors, Symp. X, IV. Int. Congr. of Biochem., Vienna, P. 201 (1959).
(50) Alexander, B.: Blood Clotting Factors, Symp. X, IV. Int. Congr. of Biochem., Vienna, P. 37 (1959).
(51) Alkjaersig, N., E. Deutsch and W. H. Seegers: Am. J. of Physiol. **180**, 367 (1955).
(52) Sherry, S., W. Troll, and H. Glueck: Phys. Rev. **34**, 736 (1954).
(53) Seegers, W. H., and W. G. Levine: VII. Annual Symp. on Blood (17—18. Jan. 1958), Referat in: Thromb. Diath. Haem. **2**, 189 (1958).
(54) Lamy, F., and W. H. Waugh: Phys. Rev. **34**, 722 (1954).
(55) Eagle, H., and T. N. Harris: J. Gen. Physiol. **20**, 543 (1936).
(56) Seegers, W. H.: Blood Clotting Factors, Symp. X, IV Int. Congr. of Biochem., Vienna, P. 18 (1959).
(57) Seegers, W. H., N. Alkjaersig and S. A. Johnson: Am. J. of Physiol. **181**, 589 (1955).
(58) Alkjaersig, N., T. Abe, S. A. Johnson and W. H. Seegers: Am. J. of Physiol. **182**, 443 (1955).
(59) Penner, J. A., F. Duckert, A. J. Shirley and W. H. Seegers: Can. J. of Biochem. and Physiol. **34**, 1199 (1956).
(60) Alkjaersig, N., and W. H. Seegers: Am. J. of Physiol. **183**, 111 (1955).
(61) Soulier, J. G., und C. Weilland: VII. Europäischer Kongreß, London, S. 220 (1959).
(62) Seegers, W. H., J. F. Johnson and C. Fell: Am. J. of Physiol. **176**, 97 (1954).
(63) Monkhouse, F. C., E. S. France and W. H. Seegers: Circulating Research, **3**, 397 (1955).
(64) Seegers, W. H., M. Yoshinari, M. and R. H. Landaburu, in press.
(65) Marckwardt, F. und P. Walsmann: Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiolog. Chemie **317**, 64 (1959).
(66) Gladner, J. A., and K. Laki: J. Am. Chem. Soc. **80**, 1263 (1958).
(67) Ehrenpreis, S., S. J. Leach and H. A. Scheraga: J. Am. Chem. Soc. **79**, 6086 (1957).
(68) Martin, Ch. J., J. Golubow and A. E. Axelrod: J. Biol. Chem. **234**, 294 (1959).
(69) Martin, Ch. J., J. Golubow, and A. E. Axelrod: J. Biol. Chem. **234**, 1718 (1959).
(70) Seegers, W. H.: The enzymes **2**, 1106 (1951).
(71) Miller, K. D., R. K. Brown, G. Casillas and W. H. Seegers: Thromb. Diath. Haem. **3**, 362 (1959).
(72) Landaburu, R. H., and W. H. Seegers: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **94**, 708 (1957).
(73) Gladner, J. A., and K. Laki: Arch. Biochem. Biophys. **62**, 501 (1956).

(74) Laki, K., J. A. Gladner and D. R. Kominz: VII. Annual Symp. on Blood (17.—18. Jan. 1958), Referat in: Thromb. Diath. Haem. **2**, 188 (1958).
(75) Scheraga, H. A.: Blood Clotting Factors, Symp. X, IV. Int. Congr. of Biochem. Vienna, P. 212 (1959).
(76) Ehrenpreis, S., M. Laskowski, Th. H. Donelly and H. A. Scheraga: J. Am. Chem. Soc. **80**, 4255 (1958).
(77) Miller, K. D.: VII. Annual Symp. on Blood (17.—18. Jan. 1958), Referat in: Thromb. Diath. Haem. **2**, 189 (1958).
(78) Guest, M. M., and A. C. Ware: Science **112**, 21 (1950).
(79) Salmon, J., et Y. Bounameaux: Thromb. Diath. Haem. **2**, 93 (1958).
(80) Brinkhous, K. M., and R. M. Wagner: Blood clotting Factors, Symp. X, IV. Int. Congr. of Biochem., Vienna, P. 1 (1959).
(81) Johnson, S. A., and W. H. Seegers: Revue d' Hématologie **9**, 529 (1954).
(82) Bergmann, M., and J. S. Fruton: J. Biol. Chem. **118**, 405 (1937).
(83) Bergmann, M., and J. S. Fruton: J. Biol. Chem. **124**, 321 (1938).
(84) Fruton, J. S., and M. Bergmann: J. Biol. Chem. **145**, 253 (1942).
(85) Bergmann, M., J. S. Fruton and H. Pollok: J. Biol. Chem. **127**, 643 (1939).
(86) Schwerth, G. H., H. Neurath, S. Kaufman and J. E. Snoke: J. Biol. Chem. **172**, 221 (1948).
(87) Snoke, J. E., G. W. Schwerth and H. Neurath: J. Biol. Chem. **175**, 7 (1948).
(88) Kaufman, S., H. Neurath and G. W. Schwerth: J. Biol. Chem. **177**, 793 (1949).
(89) Ravin, H. A., Ph. Bernstein and A. M. Seligman: J. Biol. Chem. **208**, 1 (1954).
(90) Kaufman, E., and H. Neurath: J. Biol. Chem. **175**, 893 (1948).
(91) Fuchs, H. J., und Z. Zakrzewski: Klin. Wschr. **13**, 1511 (1934).
(92) Neurath, H., and G. W. Schwerth: Chem. Rev. **46**, 69 (1950).
(93) Lorand, L., and E. P. Yudkin: Biochem. Biophys. Acta **25**, 437 (1956).
(94) Hestrin, S.: J. Biol. Chem. **180**, 249 (1949).
(95) Iselin, B. M., and C. J. Niemann: J. Biol. Chem. **182**, 821 (1950).
(96) Roberts, Ph. S.: J. Biol. Chem. **232**, 285 (1958).
(97) Glueck, H.: J. of Lab. and Clin. Med. **49**, 41 (1957).
(98) Hudemann, S.: Kolloid-Zeitschr. **92**, 742 (1954).
(99) Schultze, H. E., und G. Schwieck: Hoppe-Seyler's Zeitschr. für physiolog. Chemie **289**, 26 (1951).
(100) Seegers, W. H., R. S. Shepard and R. H. Landaburu, in press.
(101) Landaburu, R. H., and W. H. Seegers: VII. Annual Symp. on Blood (17.—18. Jan. 1958), Referat in: Thromb. Diath. Haem. **2**, 190 (1958).
(102) Glueck, H. J., S. Sherry and W. Troll: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **87**, 646 (1954).
(103) Riedel, A., E. Wünsch und A. Hartl: Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiolog. Chemie **316**, 61 (1959).
(104) Tuppy, H., und H. Nesvadba: M. H. f. Chemie **5**, 977 (1957).
(105) Müller-Hartburg, W., H. Nesvadba und H. Tuppy: Arch. f. Gynäk. **191**, 442 (1959).
(106) Sheehan, J. C., M. Goodman and G. D. Hess: J. Am. Chem. Soc. **77**, 1367 (1955).
(107) Ishai, B., and A. Berger: J. org. Chem. **17**, 1564 (1952).
(108) Bergmann, M.: J. Biol. Chem **127**, 643 (1939).
(109) Gisn, D. T., and F. H. Carpenter: J. Am. Chem. Soc. **75**, 5872 (1953).
(110) Fischer, E., and O. Gerngross: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. **42**, 1485 (1909).
(111) Synge, R. L. M.: Biochem. J. **42**, 99 (1948).
(112) Rauen, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg (1956).
(113) Astrup, T., and S. Darling: J. Biol. Chem. **133**, 761 (1940).

(114) Milstone, J. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **103**, 361 (1960).
(115) Didisheim, P., and H. L. Jessica: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **93**, 10 (1956).
(116) Klobusitzky, D. v.: Klin. Medizin **9**, 310 (1934).
(117) Eagle, H.: J. Exper. Med. **65**, 613 (1937).
(118) Henriques, O. B., A. A. C. Lavras, M. Fichman, F. R. Mandelbaum and S. B. Henriques: Biochem. J. **68**, 597 (1958).
(119) Holtz, P., und H. W. Raudonat: Arch. Exper. Path. u. Pharmak. **229**, 113 (1956).
(120) Habermann, E.: Arch. Exper. Path. u. Pharmak. **234**, 291 (1958).
(121) Janszky, B.: Science **112**, 173 (1950).
(122) Blombäck, B.: Thromb. Diath. Haem. **1**, 76 (1957).
(123) Rocha e Silva, M., and S. A. Andrade: Arch. Inst. Biol., S. Paulo, **16**, 115 (1945).
(124) Hamberg, U. et M. Rocha e Silva: Arch. Int. de Pharmacodynamie et de Thérapie **110**, 222 (1958).
(125) Deutsch, H. F., and C. R. Diniz, J. Biol. Chem. **216**, 17 (1955).
(126) Wagner, R. H., and R. A. Farrell: Thromb. Diath. Haem. **3**, 548 (1959).
(127) Rapaport, S. J., K. Aas and P. A. Owren: Scand. J. Clin. Invest. **6**, 81 (1954).
(128) Peden, C. J., and A. C. Peacock: J. Lab. and Clin. Med. **52**, 101 (1958).
(129) Georgatsos, J. G., C. V. Hussey and H. J. Quick: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **97**, 674 (1958).
(130) Michl, H., und G. Kiss: M. H. f. Chemie **90**, 604 (1959).
(131) Sherry, S., N. Alkjaersig: Thromb. Diath. Haem. **1**, 264 (1957).
(132) Sherry, S., A. P. Fletcher and N. Alkjaersig: Phys. Rev. **39**, 343 (1959).
(133) Geiger, W. B.: J. Immunol. **69**, 597 (1952).
(134) Müllertz, S., and M. Lassen: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **82**, 264 (1953).
(135) Sherry, S.: J. Clin. Invest. **33**, 1054 (1954).
(136) Troll, W., and S. Sherry: J. Biol. Chem. **213**, 881 (1955).
(137) Shulman, S., N. Alkjaersig and S. Sherry: J. Biol. Chem. **233**, 91 (1958).
(138) Christensen, L. R.: J. Clin. Invest. **28**, 163 (1949).
(139) Lewis, J. H., A. C. Howe and J. H. Ferguson: J. Clin. Invest. **28**, 1507 (1949).
(140) Pillemer, L., O. D. Ratnoff, L. Blum and J. H. Lepow: J. Exper. Med. **97**, 573 (1953).
(141) Alkjaersig, N., A. P. Fletcher and S. Sherry: J. Biol. Chem. **233**, 81 (1958).
(142) Remmert, L. F. and Cohen, P.: J. Biol. Chem. **181**, 431 (1949).
(143) Troll, W., S. Sherry and J. Wachmann: Biol. Chem. **208**, 85 (1954).
(144) Alkjaersig, N., A. P. Fletcher and S. Sherry: J. Biol. Chem. **233**, 86 (1958).
(145) Lineweaver, H., and D. Burk: J. Am. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).
(146) Ware, A. G., and W. H. Seegers: Americ. J. Clin. Path. **19**, 371 (1949).
(147) Biggs, R. und A. S. Douglas: J. Clin. Path. **6**, 23 (1953).

Lebenslauf

In Calw wurde ich, Barbara Köbele, am 8. Mai 1936 als Tochter des Dr. med. Hans Köbele und seiner Ehefrau Dr. med. Lisel Köbele, geb. Alius, geboren. Nach dem Besuch der Volksschule Calw von September 1942 bis Juli 1946 trat ich im September 1946 in das Gymnasium Calw ein und legte dort im März 1955 die Reifeprüfung ab.

Von April 1955 bis April 1956 besuchte ich die Frauenarbeitsschule in Calw und nahm im Sommersemester 1956 an der Universität Tübingen das Medizinstudium auf. Nach fünf vorklinischen Semestern bestand ich dort im Juli 1958 das Physikum.

Das klinische Studium begann ich im Wintersemester 1958/1959 an der Universität Wien. Während meiner Famulatur im Februar 1959 bei Herrn Professor Dr. med. Erwin Deutsch an der I. Medizinischen Universitätsklinik in Wien bot mir dieser die Möglichkeit, im Laboratorium der Klinik die Versuche zu meiner Doktorarbeit durchzuführen. Nach Rücksprache mit Herrn Professor Dr. med. Walter Dick, dem Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen, und mit dessen Einverständnis begann ich am 8. Mai 1959 die Arbeit unter Anleitung von Herrn Professor Deutsch und von Herrn Dr. Hans Nesvadba vom Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien. Im Sommersemester 1959 und im Wintersemester 1959/1960 war ich an der Universität Wien eingeschrieben. Während der vorlesungsfreien Zeit arbeitete ich an meiner Dissertation und famulierte bei Herrn Professor Deutsch. Ende April 1960 war die Arbeit abgeschlossen, und im Sommersemester 1960 setzte ich mein Studium an der Universität Tübingen fort, wo ich im Frühjahr 1962 das Staatsexamen ablegte.

Herrn Professor Dr. med. Erwin Deutsch bin ich für die im Einverständnis mit Herrn Professor Dr. med. Walter Dick erfolgte Überlassung des Themas, für sein stets verständnisvolles Entgegenkommen und seine Anregungen zu besonderem Dank verpflichtet. Herrn Dr. Hans Nesvadba danke ich sehr für die Herstellung der chemischen Substrate und für seine Ratschläge bei der Durchführung der Methode. Ferner möchte ich Herrn Dozent Dr. med. Paul Matis für seine Mühe bei der Fertigstellung und Drucklegung der Arbeit meinen besten Dank aussprechen.